



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Infeção por *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Estudo em
indivíduos assintomáticos

Salima Amirali Jamal

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE TROPICAL

OUTUBRO, 2017



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Infeção por *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Estudo em
indivíduos assintomáticos**

Autor: Salima Amirali Jamal

Orientadora: Doutora Rosa Maria Figueiredo Teodósio
Professora Auxiliar da Unidade de Ensino e Investigação (UEI) de Clínica Tropical, Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa (UNL)

Coorientadora: Doutora Maria Luísa Jorge Vieira
Investigadora Auxiliar da UEI de Microbiologia Médica, Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme, IHMT, UNL.

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
SAÚDE TROPICAL**

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado, contou com importantes apoios, sem os quais não teria sido possível concluir este trabalho.

À Professora Doutora Rosa Teodósio e à Investigadora Doutora Maria Luísa Vieira, pela orientação, apoio, disponibilidade, pelas críticas e opiniões, pela transmissão de conhecimentos e total colaboração na resolução dos problemas que foram surgindo, assim como as dúvidas ao longo da realização desta dissertação.

À Mestre Teresa Carreira, pela ajuda preciosa ao nível laboratorial, pela sua paciência, conhecimento e boa disposição.

À Doutora Mónica Nunes, pela boa disposição e conhecimentos bibliográficos sobre o tema desta dissertação.

Aos meus colegas, que partilharam muitos momentos ao longo deste mestrado.

Por último, porque sozinha não seria possível, àqueles que direta ou indiretamente colaboraram para que terminasse esta etapa. A Deus, aos meus pais, à minha irmã, aos meus familiares e amigos, que estiveram sempre presentes nos bons e acima de tudo nos maus momentos, pela amizade, apoio incondicional, incentivo, paciência e ajuda na superação de todas os obstáculos que foram surgindo ao longo desta jornada.

A todos e em especial aos últimos, o meu muito obrigado!

RESUMO

A Borreliose de Lyme (BL) é uma doença infecciosa, multissistémica e emergente. É causada por bactérias (espiroquetas) do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), que são transmitidas aos humanos e animais, pela mordedura de carraças (ixodídeos), principalmente da espécie *Ixodes ricinus*. Em Portugal a borreliose de Lyme é uma doença de notificação obrigatória desde 1999, no entanto é subdiagnosticada, o que em parte se deve ao facto de cursar com sinais e sintomas sobreponíveis a outras doenças e ainda, porque pode evoluir de forma assintomática. De facto, tem-se verificado que há indivíduos que apesar de terem sido infetados por borrelíias, não desenvolvem sintomas clínicos. Por outro lado, também se sabe que estas bactérias são capazes de sobreviver nos componentes sanguíneos após dádiva de sangue pelo que se questiona a possibilidade de transmissão deste agente infeccioso por hemotransfusão.

O principal objetivo deste estudo foi determinar os indivíduos com anticorpos anti- *B. burgdorferi* s.l. e relacionar esses achados com as características socio demográficas, clínicas, de viagens e fatores de risco de infeção.

Para esta investigação, foram colhidas 129 amostras de sangue, obtidas de igual número de participantes (voluntários) assintomáticos para BL, aos quais se solicitou também o preenchimento de um inquérito clínico-epidemiológico sob consentimento informado. Os respetivos soros foram avaliados laboratorialmente por dois testes: Imunofluorescência Indireta (IFA), como teste de rastreio, seguido de um teste confirmatório, *Western Blot* (WB), nas amostras com resultado positivo ou *borderline*, isto é, com título $\geq 1/256$ ou $1/128$, respetivamente. Foram reativas para IFA, 41 amostras (31,8%). Destas, a avaliação pelo WB -IgM e -IgG revelou reatividade específica para BL em nove (9) dos indivíduos, com a seguinte distribuição: três amostras positivas (duas para IgM e uma para IgG) e seis com resultados *borderline* (duas para IgM e quatro para IgG). Apesar destes nove indivíduos não terem tido contacto com a carraça, os dados epidemiológicos mostraram que estiveram expostos a outros fatores de risco.

Embora a amostra populacional seja reduzida, foi possível verificar que indivíduos assintomáticos podem, ao longo da sua vida, ter contactado com o agente infeccioso, como foi demonstrado pela avaliação serológica realizada. Estes resultados embora preliminares, podem constituir no futuro, uma importante informação para potenciais dadores de sangue.

Palavras-chave: Borreliose de Lyme; Anticorpos anti-*B. burgdorferi* s.l.; Imunofluorescência indireta (IFA); *Western Blot*; Portugal.

ABSTRACT

Lyme Borreliosis (LB) is an infectious, multisystemic and emerging disease. It is caused by bacteria (spirochetes) of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex (s.l.), which are transmitted to humans and animals by the bite of ticks (ixodids), mainly of the *Ixodes ricinus* species. In Portugal, Lyme borreliosis is a notifiable disease since 1999. However, it is underdiagnosed, which is due in part to the fact that it has signs and symptoms that can be confused with other illnesses, and also because it can evolve asymptotically. Thus, it has been verified that there are individuals who, despite being infected by borreliae, do not develop clinical symptoms. On the other hand, it is also known that these bacteria can survive in the blood components after the donation of blood, reason why the possibility of transmission of the infectious agent by hemotransfusion is questioned.

The principal objective of this study was to evaluate the presence of antibodies against *B. burgdorferi* s.l., in asymptomatic individuals and to relate these findings with socio-demographic, clinical, travels and exposure to risk factors for infection.

For this investigation, a total of (N = 129) blood samples was taken from LB asymptomatic participants (volunteers) who were also asked to complete a clinical-epidemiological survey, under informed consent. The respective sera were laboratory-assessed with a two-step approach, which included performing an indirect immunofluorescence assay (IFA) as a screening test, followed by a confirmatory Western blot (WB) test for the positive samples or borderline (titer $\geq 1/256$ or $1/128$), respectively. Samples (n=41; 31.8%) were reactive by IFA. Of these, the WB -IgM and -IgG evaluation revealed nine (9) individuals with specific reactivity for LB, with the following distribution: three positive samples (two for IgM and one for IgG) and six samples with borderline results (two for IgM and four IgG). Although these individuals did not have contact with the tick, the survey data showed that they were exposed to other risk factors.

Despite a reduced population sample, it was possible to verify that asymptomatic individuals may, throughout their life, have contacted the infectious agent, as demonstrated by the serological evaluation performed. These preliminary results may constitute, in the future, valuable information for potential blood donors.

Keywords: Lyme Borreliosis; Antibodies anti-*B. burgdorferi* s.l.; Immunofluorescence Assay (IFA); *Western Blot*; Portugal

LISTA DE ABREVIATURAS

ACA – Acrodermatite crónica atrófica

BL – Borreliose de Lyme

BSK-II - Barbour-Stoenner-Kelly II

CDC – Center of Diseases Prevention and Control

CEVDI - Centro de Pesquisas de Vetores e Doenças Infeciosas

DDO – Doença de Declaração Obrigatória

DL – Doença de Lyme

DNA - Deoxyribonucleic Acid

ECDC – European Center of Diseases Prevention and Control

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EM – Eritema *migrans*

EUA – Estados Unidos da América

IFA – Imunofluorescence Assay

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

IL-4 – Interleucina – 4

IL-12 – Interleucina - 12

IFN- γ – Interferão gama

KDa - KiloDalton

LBL – Leptospirose e Borreliose de Lyme

LCR – Líquido Céfalo Raquidiano

LPS – Lipossacarídeos

NB - Neuroborreliose

PCR – Polymerase Chain Reaction

SI – Sistema Imunitário

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TNF – Tumor Necrosis Factor

WB – Western Blot

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE QUADROS.....	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xii

INTRODUÇÃO

1. BORRELIOSE DE LYME - CONHECIMENTO ATUAL	2
1.1. Contexto histórico.....	2
1.2. Epidemiologia	3
1.3. Borreliose de Lyme em Portugal	4
1.4. Caracterização do agente etiológico - <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	6
1.4.1. Taxonomia e distribuição geográfica	6
1.4.2. O agente – bactérias do complexo <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.....	7
1.5. Vetor, transmissão e hospedeiros.....	10
1.6. Manifestações clínicas	14
1.6.1. Fase I - Infecção localizada (Fase Aguda)	15
1.6.2. Fase II - Infecção Disseminada.....	16
1.6.3. Fase III - Doença tardia (Fase Crónica)	17
1.7. Diagnóstico clínico	20
1.8. Diagnóstico laboratorial.....	20
1.8.1. Métodos indiretos	21
1.8.2. Métodos diretos	24
1.9. Indivíduos assintomáticos.....	25
1.10. Tratamento	26
1.11. Objetivos.....	28

AMOSTRA POPULACIONAL E MÉTODOS

2. AMOSTRA POPULACIONAL E MÉTODOS	30
2.1. Tipo de Estudo	30
2.2. Amostragem.....	30

2.3. Instrumento de colheita de dados.....	30
2.4. Amostras biológicas.....	31
2.5. Meio de cultura e condições de crescimento	31
2.6. Diagnóstico imunológico	32
2.6.1. Técnica de imunofluorescência indireta (IFA).....	32
2.6.2. Técnica de Western Blot (WB)	33
2.7. Operacionalização de variáveis.....	34
2.8. Tratamento dos dados	37
2.9. Considerações éticas	38

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.1 Caracterização da população em estudo	40

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
--	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
------------------------------------	----

ANEXOS

6. ANEXOS.....	75
----------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Dr. Willy Burgdorfer isola pela primeira vez o agente da Borreliose de Lyme (Fonte: NYTIMES)	3
Figura 2 – Distribuição anual dos casos de Borreliose de Lyme em Portugal (1999-2014) (Fonte: Berger, 2017)	5
Figura 3 - Representação esquemática da distribuição mundial de espécies de carrças do género <i>Ixodes</i> . (Stanek, et al., 2012).....	7
Figura 4 - Estrutura e morfologia da bactéria <i>B. burgdorferi</i> s.l. A) microfotografia eletrónica (Fonte: Rosa, et al., 2005).....	8
Figura 5 - Representação esquemática de um espiroquetídeo do complexo <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.: bactéria inteira, mostrando o flagelo; estrutura interna e pormenor do flagelo (Fonte: Rosa, et al., 2005)	9
Figura 6 - Distribuição atual da espécie <i>Ixodes ricinus</i> na Europa, Norte de África e parte da Ásia (janeiro de 2017) (Fonte: ECDC 2017)	11
Figura 7 - Ciclo enzoonótico do complexo <i>B. burgdorferi</i> s.l. Adaptado de Radolf et al., 2012 (Fonte: Radolf, et al., 2012).....	12
Figura 8 - Recomendações atuais do CDC para o diagnóstico serológico de Borreliose de Lyme (Adaptado de: CDC, 2015).....	21
Figura 9 - Microfotografia de uma reação de imunofluorescência (IFA) positiva (ampliação 1000x) (fotografia original do autor)	22
Figura 10 - Representação de um “blot” (membrana de nitrocelulose) com antígenos	24
Figura 11 - Distribuição em percentagem dos participantes do estudo por género.....	40
Figura 12 - Distribuição dos participantes do estudo por classes etárias (classe de idades).	41
Figura 13 - Representação gráfica da distribuição da população em estudo de acordo com o contacto com carrças reportado	44
Figura 14 - Representação gráfica da distribuição do Risco de BL em viagem [Zona de risco (n=109) e Zona endémica (n=76)] em indivíduos do total de participantes no estudo (N=129).	46
Figura 15 - Representação gráfica da distribuição das atividades de lazer praticadas por (n=124) indivíduos do total de participantes do estudo.....	47

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1- As três fases da Borreliose de Lyme e exemplos de manifestações clínicas	19
Quadro 2 - Infecções e doenças associadas a reações cruzadas nos testes serológicos para Borreliose de Lyme (Fonte: Adaptado de Murray, et al., 2014).....	22
Quadro 3 - Variáveis socio demográficas e clínicas do estudo e as suas definições	35
Quadro 4 - Medidas de tendência central para a variável “idade” dos participantes do estudo.....	41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela de frequências dos participantes do estudo quanto à “nacionalidade”	42
Tabela 2 – Distribuição dos participantes de acordo com a “variável” atividade profissional	43
Tabela 3 - Tabela de frequências da variável “profissão de risco” fase à BL da amostra populacional do estudo	43
Tabela 4 - Tabela de frequências relativa às variáveis “ter cão” e “contacto com cães” de acordo com as respostas dos participantes do estudo	45
Tabela 5 - Distribuição dos sintomas major relacionados com BL descritos pelos participantes do estudo	48
Tabela 6 - Tabela de frequências dos títulos obtidos pelo teste IFA na amostra populacional dos participantes do estudo	48
Tabela 7 - Frequências dos resultados (Negativos, Borderline e Positivos) obtidos nos testes Western Blot - IgM e – IgG	49
Tabela 8 - Perfil dos participantes com resultados positivo e <i>borderline</i> no teste <i>Western Blot</i> relacionadas com as características mais importantes/de maior destaque deste estudo	53

INTRODUÇÃO

1. BORRELIOSE DE LYME - CONHECIMENTO ATUAL

1.1. Contexto histórico

O diagnóstico clínico para a Borreliose de Lyme (BL) é relativamente recente, no entanto as descrições das suas manifestações clínicas remontam ao final do século XIX. Em 1883, Alfred Buchwald, observou pela primeira vez manifestações dermatológicas da doença, que agora conhecemos como acrodermatite crônica atrófica (ACA). No início do século XX, Benjamin Lipschutz e Arvid Afzelius fizeram as primeiras descrições do eritema *migrans* (EM) na Europa. Afzelius, em 1910, descreveu essas lesões associadas à mordedura de carraça. Em 1948, Lennhoff especulou sobre a origem da doença (origem bacteriana). Thyresson, em 1949, tratou os casos de EM e ACA com penicilina (Sternbach & Dibble, 1996; Bhate & Schwartz, 2011a; Meléndez *et al.*, 2014).

Em 1975, nos EUA, em três comunidades do estado de Connecticut (Old Lyme, Lyme e East Haddam), foram estudados um total de 51 casos (39 crianças e 12 adultos) dado apresentarem, além de artrite monoarticular ou oligoarticular, outras manifestações clínicas, tais como febre, cefaleias, fadiga, mialgias e erupção cutânea. Foi então sugerido, que a designação da doença fosse "artrite de Lyme" (Sternbach & Dibble, 1996).

Devido à associação geográfica dos casos a áreas densamente arborizadas, escassamente povoadas e um pico de ocorrência nos meses de verão, levou a que Steere e seus colaboradores, considerassem que esta doença tivesse origem em agentes transmitidos por um vetor artrópode, apesar de apenas um dos doentes se recordar da mordedura da carraça (Sternbach & Dibble, 1996).

A descoberta do agente causal da BL, também conhecida como Doença de Lyme (DL), surgiu em 1982, por Willy Burgdorfer, que conseguiu isolar o microorganismo responsável da doença, que se encontrava no interior do intestino médio de carraças do género *Ixodes*, concluindo-se depois que se tratava de uma espiroqueta. Tendo em consideração as suas características ultra-estruturais e a análise de DNA, foi identificada como um membro do género *Borrelia*. Em homenagem a Willy Burgdorfer, recebeu o nome de *Borrelia burgdorferi* (Sternbach & Dibble, 1996; Meléndez *et al.*, 2014).



Figura 1 – Dr. Willy Burgdorfer isola pela primeira vez o agente da Borreliose de Lyme (Fonte: NYTIMES)

1.2. Epidemiologia

A BL é uma doença zoonótica que apresenta uma distribuição universal, tendo já sido diagnosticada em todos os continentes, sendo endêmica na América do Norte, Europa e Ásia (Schnarr *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2010; Bhate & Schwartz, 2011a).

O CDC (*Center of Disease Control and Prevention*), estima que anualmente, cerca de 300 mil pessoas sejam diagnosticadas com BL nos EUA. Estes casos ocorrem principalmente nas regiões Nordeste e Centro Oeste do país (CDC, 2015).

Segundo o ECDC (*European Center for Disease Prevention and Control*) a BL na Europa é a doença mais comum, entre as que são transmitidas por mordedura de carraça e tem existido um aumento de casos reportados nas últimas duas décadas (>360 000 casos/ano) (ECDC, 2014).

A situação epidemiológica na Europa é difícil de descrever, visto que as estratégias de vigilância variam de país para país. Apenas alguns países consideram a BL uma Doença de Declaração Obrigatória (DDO), o que apenas possibilita ter estimativas aproximadas das incidências da doença. No entanto, mesmo nos países em que BL é uma DDO, os critérios de diagnóstico serológico e seropositividade ligada a uma exposição anterior são

variáveis, assim como se observa a subnotificação de casos diagnosticados clinicamente, incluindo os que apresentam EM (Stanek *et al.*, 2011; Rizzoli *et al.*, 2011).

Apesar de todas as limitações na notificação da doença, a BL apresenta na Europa, uma incidência geográfica crescente do Oeste para o Leste, com incidências elevadas na Europa Central (exemplo: Suécia 464 casos por 100 000 habitantes). Outros países como, Alemanha, Eslovénia, Áustria, Países Bálticos, também apresentam incidências acima dos 100/100 000 habitantes, em contraste o Reino Unido e a Irlanda, têm incidências baixas da doença na ordem dos 0,7 e 0,6 casos por 100 000 habitantes respetivamente (Lindgren & Jaenson, 2006; Rizzoli *et al.*, 2011; Stanek *et al.*, 2011; Sykes, 2014).

Segundo Smith e seus colaboradores, existe uma distribuição de idade bimodal para os casos relatados de BL nos EUA. Observa-se um pico na taxa média anual nas crianças dos 5 aos 9 anos (8,6 casos por 100 000 habitantes) e nos adultos entre os 55 e os 59 anos (7,8 casos por 100 000 habitantes). No que respeita à sazonalidade a maioria dos casos ocorre nos meses de junho, julho e agosto (Bhate & Schwartz, 2010a; Smith *et al.*, 2011). Em áreas endémicas, as pessoas com exposição ocupacional (caça, agricultura, atividades militares, entre outras), e/ou recreativa ("jogging", campismo, jardinagem e outras atividades ao ar livre) ou ainda residencial em campos e zonas florestadas, têm uma maior probabilidade para desenvolver BL (Lindgren & Jaenson, 2006; EUCALB, 2009; Murray & Shapiro, 2010).

1.3. Borreliose de Lyme em Portugal

Em Portugal, em 1989, na região de Évora, foi diagnosticado por David Morais e colaboradores, o primeiro caso clínico de BL. Em estudos posteriores, a mesma equipa de investigadores confirmou que a BL apresenta uma ocorrência generalizada em Portugal Continental, com uma maior exposição às carrças em área rural. Mais tarde foi confirmada a ampla distribuição no país do vetor *Ixodes ricinus*, como ectoparasita de animais domésticos e em espécies silváticas (Collares-Pereira & Franca, 2000).

Decorria o ano de 1993 quando foi isolada pela primeira vez uma nova *Borrelia* do complexo *B. burgdorferi* s.l., designada inicialmente pelo acrónimo ‘Poti’ (de **P**ortugal **t**ick) a partir do vetor, pela equipa de investigadores do Centro de Pesquisas de Vetores e Doenças Infecciosas (CEVDI), do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). A partir de 1999, a BL passou a ser considerada uma DDO (Núncio & Carvalho, 2014; Collares-Pereira *et al.*, 2004). A Investigadora Margarida Collares- Pereira e a sua equipa, obtiveram em 2003 o primeiro isolado humano, em Portugal e no Mundo, que correspondia à borrelia previamente isolada no vetor, no CEVDI, a qual foi então designada como *B. lusitaniae* a partir de uma biopsia de lesão cutânea de uma doente (Collares-Pereira *et al.*, 2004; Schwarz *et al.*, 2012).

Um estudo realizado em Portugal, pelo INSA comparou os dados disponíveis no laboratório do CEVDI, entre 1990-2004, com os casos notificados a partir de 1999-2004 (ano inicial da notificação obrigatória). Estes dados mostraram que apesar de ser considerada uma DDO, a BL é claramente subnotificada em Portugal, o que não permite uma análise consistente no que se refere aos fatores de risco e ao impacto na Saúde Pública. Tendo em conta os dados laboratoriais estima-se que a taxa de incidência da doença no nosso país seja de 0,4 por 100 000 habitantes (Carvalho & Núncio, 2006).

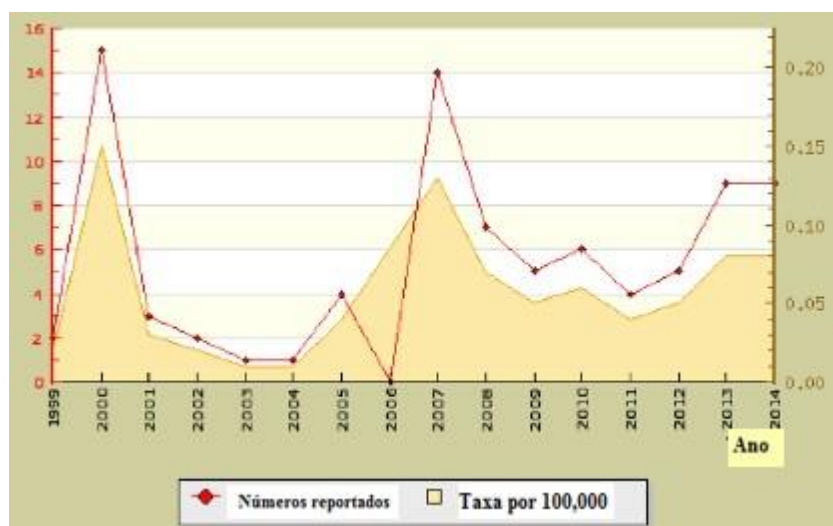


Figura 2 – Distribuição anual dos casos de Borreliose de Lyme em Portugal (1999-2014) (Fonte: Berger, 2017)

Mais recentemente, Stephen Berger (2017), coligiu os dados desta doença em Portugal (**Figura 2**) onde se observa que a taxa de incidência em 2014 era de 0,8 por 100 000 habitantes.

Em Portugal, são conhecidas cinco espécies circulantes de *Borrelia* do complexo *B. burgdorferi* s.l., sendo *B. garini* e *B. lusitaniae* as mais prevalentes nas carraças da espécie *I. ricinus*. No entanto, outras espécies como *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.) e *B. turdi* também já foram detetadas no país (Núncio & Carvalho, 2014).

1.4. Caracterização do agente etiológico - *Borrelia burgdorferi* sensu lato

1.4.1. Taxonomia e distribuição geográfica

Do ponto de vista taxonómico, o género *Borrelia* pertence ao Filo Spirochaetes, Classe Spirochaetia, Ordem Spirochaetales, e Família Spirochaetaceae. Os outros três géneros da família Spirochaetaceae são *Treponema*, *Spirochaeta* e *Cristispiria*. Sendo que destes, apenas o primeiro tem importância médica, tal como o Género *Borrelia* (Wang & Schwartz, 2011).

O complexo *B. burgdorferi* s.l. é atualmente constituído por 20 genoespécies do género *Borrelia* (Margos *et al.*, 2011; Ivanova *et al.*, 2013). No entanto, existem outras genoespécies que ainda não foram caracterizadas filogeneticamente (Franke *et al.*, 2013). Das genoespécies conhecidas, algumas são patogénicas (causadoras de BL), outras são não patogénicas e há ainda espécies de patogenicidade incerta (Margos *et al.*, 2011). No continente Europeu, são conhecidas cinco espécies de *Borrelia*, que inequivocamente causam BL. Estas espécies são: *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii* e *B. bavariensis* (Stanek *et al.*, 2012). Porém, as espécies *B. valaisiana*, *B. bissettii* e *B. lusitaniae* já foram igualmente isoladas em humanos, mas de forma mais pontual (Hubalek & Halouzka, 1997; Collares-Pereira *et al.*, 2004; Stanek & Reiter, 2011). As restantes espécies são consideradas não patogénicas ou de patogenicidade desconhecida (Wang & Schwartz, 2011).

Segundo vários estudos, apesar da atual existência de várias espécies de *Borrelia* nos EUA, a espécie *B. burgdorferi* s.s. continua a ser a única que causa doença (Murray &

Shapiro, 2010; Shapiro, 2014). Porém, recentemente, Pritt e col., também encontraram espiroquetas de outras espécies de *Borrelia* em doentes americanos (Pritt *et al.*, 2016).

Na Europa, a espécie *B. burgdorferi* s.s. é mais frequente no Leste, enquanto *B. afzelii* é mais comum no Norte. Por sua vez, *B. valaisiana* está presente principalmente em regiões de baixa temperatura com vegetação rasteira, como são exemplo a costa Escandinava, Escócia ou regiões alpinas, sendo que *B. lusitaniae* e *B. garinii* predominam na região mediterrânea, sudeste e oeste europeus (Franke *et al.*, 2013). Nos últimos anos, a distribuição geográfica da BL tem aumentado significativamente (**Figura 3**), o que implica que a mobilidade populacional tenha impacte na Saúde Pública (Rizzoli *et al.*, 2011).

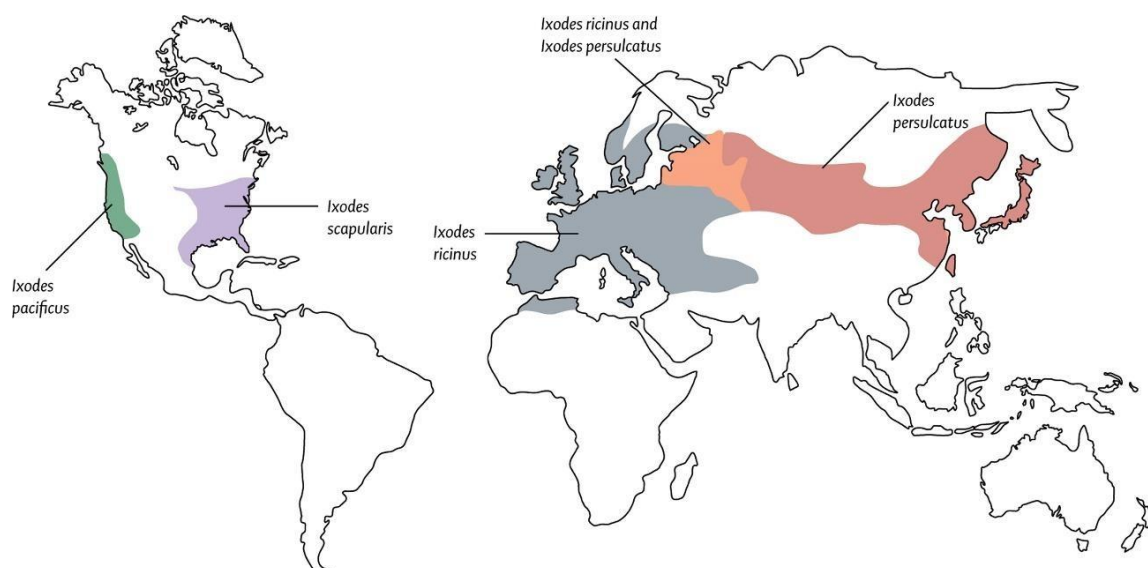


Figura 3 - Representação esquemática da distribuição mundial de espécies de carrças do género *Ixodes*. (Stanek *et al.*, 2012)

1.4.2. O agente – bactérias do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l.

As espiroquetas são bactérias que têm uma forma em espiral (**Figura 4**) característica e uma motilidade única que lhes permite movimentarem-se eficientemente através de meios altamente viscosos, comparativamente a outras bactérias, cujos movimentos são reduzidos ou inibidos (Charon & Goldstein, 2002; Tsao, 2009).

As espécies do complexo *B. burgdorferi* s.l. são bactérias (espiroquetas) gram-negativas, anaeróbias ou microaerofílicas. Estas espiroquetas têm uma membrana dupla, com 10 a 30

µm de comprimento e um diâmetro de 0,2-0,5 µm (Barbour & Hayes, 1986; Wang & Schwartz, 2011).

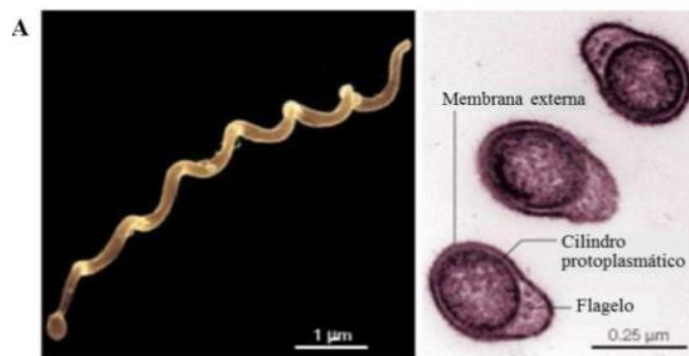


Figura 4 - Estrutura e morfologia da bactéria *B. burgdorferi* s.l. A) microfotografia eletrônica (Fonte: Rosa *et al.*, 2005)

O envelope celular é constituído por uma membrana celular interna, com uma camada de peptidoglicano e uma membrana externa com inúmeras lipoproteínas, que substituem o revestimento lipopolissacárido comum à generalidade das bactérias gram-negativas (Radolf *et al.*, 2012).

A membrana interna envolve o cilindro protoplasmático, contendo um cromossoma linear de cerca de 1000 kb bem como múltiplos plasmídeos lineares e circulares (Fraser *et al.*, 1997; Casjens *et al.*, 2000). Por sua vez, a membrana externa contém as proteínas de superfície externa (Osp) A a F, o antígeno variável de superfície (VlsE), a proteína de ligação à fibronectina (BBK32) e proteínas de ligação à decorina (DbpA e DbpB) (Bhate & Schwartz, 2011a).

No espaço periplásmico, estão ligados flagelos à membrana interna e dispostos ao redor do cilindro protoplasmático (**Figura 5**) (Burgdorfer *et al.*, 1982). O principal componente estrutural do flagelo é a flagelina, uma proteína composta pelas frações FlaA e FlaB, com 38 e 41 KDa, respectivamente (Ge, *et al.*, 1998). Os flagelos dão a estas espiroquetas a motilidade bidirecional e a capacidade de penetrar em vários tecidos e constituem um importante fator de virulência (Rosa, 1997; Sal, 2008). É ainda de referir que estas proteínas de superfície conferem às borrelíias capacidade de variação antigénica e de sobrevivência em diversos ambientes (Bhate & Schwartz, 2011a).

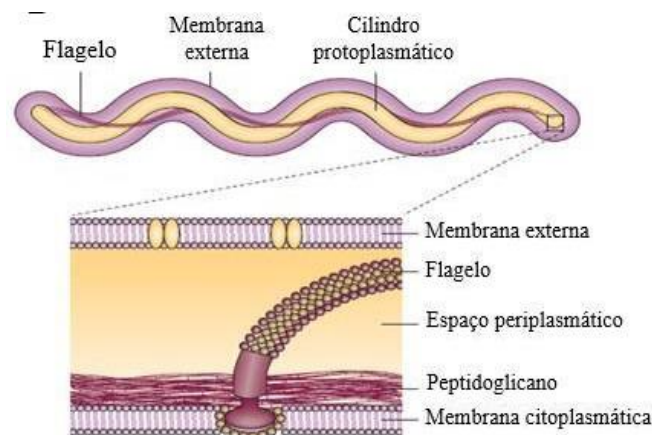


Figura 5 - Representação esquemática de um espiroquetídeo do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l.: bactéria inteira, mostrando o flagelo; estrutura interna e pormenor do flagelo (Fonte: Rosa *et al.*, 2005)

As características mais importantes que distinguem a parede celular das espiroquetas do género *Borrelia* de outras bactérias gram-negativas são a ausência de fosfatidiletanolamina e lipopolissacarídeos (LPS) e a presença de antigénios glicolipídicos não-LPS (Takayama *et al.*, 1987; Belisle *et al.*, 1994).

As espiroquetas do género *Borrelia* podem ser cultivadas *in vitro* em meio Barbour-Stoenner-Kelly II (BSK II), no seu derivado BSK-H, ou em MPK (meio de Kelly modificado) (Barbour, 1984; Preac-Mursic *et al.*, 1986; Pollack *et al.*, 1993). O crescimento das borrelíias depende essencialmente dos nutrientes disponíveis no meio de cultura ou no intestino das carrças ou ainda do hospedeiro (Wang & Schwartz, 2011). Muitos compostos, tais como o soro de coelho, são utilizados no meio de cultura e podem atuar como quimioatratores (Shi *et al.*, 1998; Bakker *et al.*, 2007). A temperatura de incubação varia entre 30 a 34°C e o tempo de crescimento/desenvolvimento pode ir de 7 a 20 horas ou até meses (Singh & Girschick, 2004).

Uma vez que as espiroquetas têm dimensões muito reduzidas a observação microscópica só é possível com microscopia de campo escuro ou contraste de fase (Singh & Girschick, 2004).

Do ponto de vista genómico, a estirpe B31, que pertence à espécie *B. burgdorferi* s.s., apresenta um genoma total de 1 521 419 pares de bases (pb), constituído por um cromossoma linear de 910 725 pb e por 21 plasmídeos (12 lineares e 9 circulares) num total de 610 694 pb (Xu *et al.*, 1996; Fraser *et al.*, 1997; Casjens *et al.*, 2000).

Alguns estudos sugerem que muitos genes plasmídicos codificam proteínas importantes para a reprodução, infecção, transmissão e persistência da espiroqueta em hospedeiros vertebrados, podendo ter implicações na capacidade de causar doença (Xu *et al.*, 1996; Glockner *et al.*, 2006).

Aa espiroquetas do género *B. burgdorferi* s.l. modificam a expressão antigénica de superfície para se adaptarem a vários ambientes durante o ciclo enzoótico, podendo expressar de forma abundante as proteínas Osp A e Osp B na carraça não alimentada. Após a refeição sanguínea desta, ocorre o aumento da expressão da Osp C e diminui a expressão da Osp A e Osp B. Este processo confere a estas espiroquetas carácter infetante. Assim as borrelíias expressam de forma abundante a Osp C, durante a primeira fase da infecção no hospedeiro. Durante a fase disseminada da infecção, com o desenvolvimento da resposta humoral específica, ocorre a diminuição da expressão da Osp C e em sentido inverso ocorre uma expressão abundante de VlsE e da proteína relacionada com a artrite (BBF01), um processo que provavelmente permite a invasão por parte da bactéria no sistema imunitário (SI) causando infecção persistente (Zhang *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2008).

Uma outra proteína envolvida neste processo é designada por p18 (equivalente a “Decorin binding protein A” [DbpA] ou Osp17) que se liga à matriz extracelular do hospedeiro. Isto vai permitir a migração bacteriana nos tecidos, com foco nas articulações e/ou na pele. A proteína p41, também conhecida por flagelina, responsável por induzir reações-cruzadas com outros microrganismos (Guo *et al.*, 1998; Ge *et al.*, 1998; Charon & Goldstein, 2002; Wolgemuth *et al.*, 2006). Por seu lado também a proteína OspC é necessária à sobrevivência bacteriana durante a ação do sistema imune inato por imunoglobulinas do tipo M (IgM) enquanto a VlsE e a p18 têm um papel importante durante a resposta do sistema imune adquirido, através da imunoglobulina do tipo G (IgG) (Tilly *et al.*, 2008).

1.5. Vetor, transmissão e hospedeiros

As carraças são artrópodes hematófagos obrigatórios que parasitam todas as classes de vertebrados em quase todas as regiões do Mundo. As carraças dividem-se em duas famílias, as de corpo duro (Ixodidae) e as de corpo mole (Argasidae). A maior parte das

espécies pertence à Família Ixodidae, que é a mais importante do ponto de vista médico (Parola & Raoult, 2001; Sonenshine & Roe, 2014).

Os dois principais agentes da BL na América do Norte são a espécie *Ixodes scapularis*, na parte oriental do país, e a espécie *Ixodes pacificus*, na parte ocidental do país. A grande maioria das infecções de BL na América do Norte são adquiridas através da mordedura de *I. scapularis*. A distribuição destas carraças é controlada tanto por fatores bióticos como abióticos (Piesman & Gern, 2004). As carraças da espécie *Ixodes scapularis* estão distribuídas ao longo da Costa Leste da Flórida até ao Maine e até ao Oeste do Texas central, não tendo uma distribuição homogênea, enquanto que as carraças da espécie *Ixodes pacificus* são encontradas ao longo da costa do Pacífico, da Colúmbia Britânica e do Canadá (Banerjee *et al.*, 1994; Ogden *et al.*, 2006).

No que respeita à Europa a espécie *Ixodes ricinus* apresenta uma distribuição geográfica mais abrangente, o que lhe permite sobreviver sob várias condições ambientais (Piesman & Gern, 2004). O ECDC divulgou recentemente (janeiro de 2017) a distribuição atual da espécie *Ixodes ricinus* na Europa, Norte de África e parte da Ásia (**Figura 6**). (ECDC, 2017)

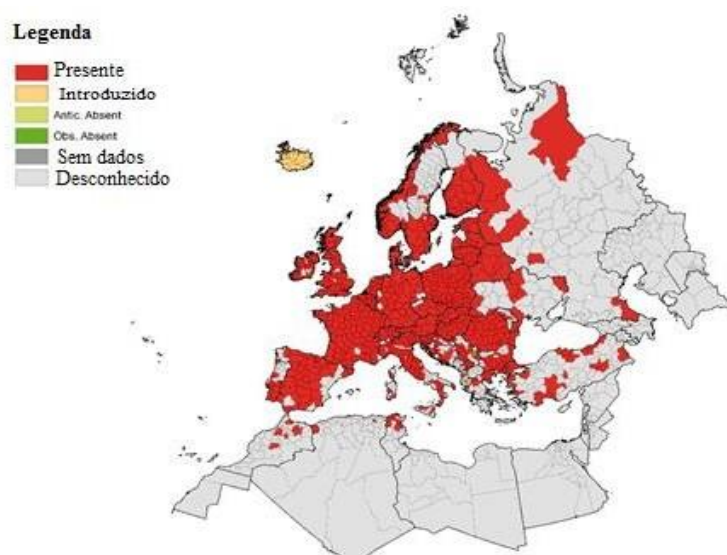


Figura 6 - Distribuição atual da espécie *Ixodes ricinus* na Europa, Norte de África e parte da Ásia (janeiro de 2017) (Fonte: ECDC 2017)

As carrças do género *Ixodes* sobrevivem a temperaturas entre -10°C e os 35°C, tolerando condições extremas, mas apenas por períodos curtos (Estrada-Pena *et al.*, 2012).

O ciclo de vida dos Ixodídeos envolve quatro fases: ovo, larva, ninfa e adulto. Após a eclosão dos ovos, a larva deve realizar uma refeição de sangue para ser capaz de se desenvolver na próxima fase (**Figura 7**) (Stanek *et al.*, 2012). Com exceção do macho adulto, cada estágio de vida requer uma refeição de sangue em hospedeiros vertebrados. A transmissão das borrelíias faz-se assim, através da transmissão horizontal entre a carrça e os hospedeiros vertebrados (Tsao, 2009). Larvas e ninfas alimentam-se principalmente durante a Primavera e o Verão, enquanto os adultos alimentam-se principalmente no Outono. O período de alimentação das carrças das espécies do género *Ixodes* é bastante longo (de vários dias a mais de uma semana) e contribui para a sua dispersão geográfica juntamente com a motilidade do hospedeiro (Parola & Raoult, 2001; Wilske, 2005).

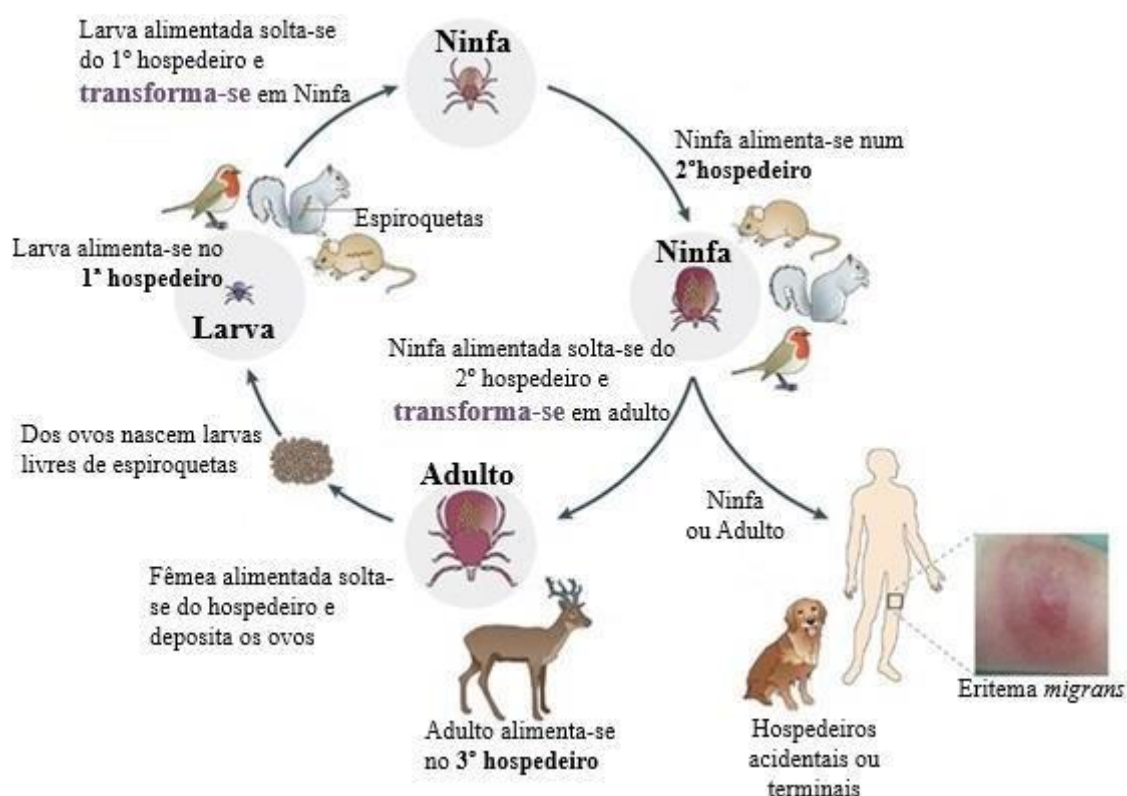


Figura 7 - Ciclo enzoontico do complexo *B. burgdorferi* s.l. Adaptado de Radolf *et al.*, 2012.

As carraças têm inúmeros órgãos sensoriais que permitem localizar os seus hospedeiros. Um mecanismo comum da espécie *I. ricinus* para o aproximar do hospedeiro é manter-se na vegetação e esperar que os mesmos passem (Parola & Raoult, 2001).

As carraças transmitem as borrélias pela inoculação cutânea das mesmas contidas nas glândulas salivares. Em carraças não alimentadas, as borrélias vivem no intestino médio. Durante a refeição sanguínea, migram para as glândulas salivares e à medida que o processo de alimentação continua, as borrélias movem-se ao longo do fluxo de saliva para o hospedeiro (De Silva & Fikrig, 1995; Hytönen *et al.*, 2008).

Normalmente, a carraça permanece ligada ao hospedeiro por vários dias durante uma refeição sanguínea. Anatomicamente, as peças bucais da carraça estão especialmente adaptadas para a fixação firme à pele do hospedeiro e a secreção salivar contém várias proteínas inibidoras do complemento, o que gera substâncias vasodilatadoras, anti-inflamatórias, anti-hemostáticas e anestésicas (Valenzuela *et al.*, 2000; Parola & Raoult, 2001; Schroeder *et al.*, 2007; Gillet *et al.*, 2009). Estes atributos facilitam o tempo prolongado de alimentação, já que a mordedura destas carraças é geralmente indolor e muitas vezes passa despercebida por longos períodos de tempo (Parola & Raoult, 2001). No caso da transmissão de espiroquetas do complexo *B. burgdorferi* s.l., foi relatado que o aumento do tempo de fixação da carraça aumenta o referido risco de transmissão das borrélias para o hospedeiro, sendo que a captação de sangue desencadeia a multiplicação de borrélias no intestino médio da carraça (Piesman *et al.*, 1987; Piesman *et al.*, 1990).

O ciclo de vida de uma carraça depende das condições ambientais, podendo durar de seis meses a seis anos, mas, normalmente, leva cerca de dois a três anos. Durante o Inverno as carraças entram em estado de repouso - diapausa - caracterizada por um metabolismo reduzido (Parola & Raoult, 2001).

Em Portugal, o vetor *I. ricinus* pode ser encontrado de Norte a Sul durante todo o ano. Tem uma distribuição heterogénea e predomina nas regiões e/ou locais sobretudo com

vegetação herbácea ou arbustiva considerável, com elevada taxa de humidade relativa e uma diversidade de hospedeiros vertebrados (Caeiro, 1999).

Os reservatórios-hospedeiros dos agentes transportados por carraças da espécie *I. ricinus* são, como referido, animais vertebrados, como aves, lagartos, veados e pequenos mamíferos (ex: roedores, esquilos, lebres). A abundância destes, em diferentes habitats, é o fator mais importante no estabelecimento de populações de carraças infetadas (Kurtenbach *et al.*, 2002; Hanincová *et al.*, 2003).

1.6. Manifestações clínicas

A BL pode apresentar uma variedade de sinais e sintomas clínicos e várias modificações no decurso da doença. A infeção também pode ser assintomática numa proporção considerável de casos, especialmente na Europa, mas também nos EUA (Strle & Stanek, 2009; O'Connell, 2009).

Em geral, as manifestações clínicas da BL são semelhantes em todo o mundo. Contudo, existem variações geográficas consideráveis na frequência e na aparência de certos sintomas. As diferentes espécies de *Borrelia* invadem diferentes órgãos (organotropismo), o que pode explicar os diferentes quadros clínicos de BL nos EUA em comparação com a doença na Europa (Schnarr *et al.*, 2006; Meléndez *et al.*, 2014; Azevedo, 2015). Em áreas endémicas, também pode ocorrer reinfeção por *Borrelia*, com o surgimento de sinais e sintomas clínicos (Golde *et al.*, 1998).

As principais manifestações clínicas são *eritema migrans* (EM), acrodermatite crónica atrófica (ACA), artrite de Lyme, linfocitoma borreliano, neuroborreliose (NB) e cardite de Lyme (Berglund *et al.*, 1995; Strle & Stanek, 2009; Stanek *et al.*, 2012).

As manifestações dermatológicas tardias (por exemplo: ACA) parecem estar associadas à espécie *B. afzelii* e são observadas na Europa, mas raramente nos EUA; por outro lado a neuroborreliose (NB) é frequentemente causada por *B. garinii* e *B. bavariensis* na Europa. As espécies *B. garinii*, *B. afzelii* e *B. burgdorferi* s. s. estão associadas à artrite de Lyme, sendo esta última espécie manifestação clínica mais frequente nos EUA do que na Europa (Canica *et al.*, 1993; Rijpkema *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999; Ornstein *et al.*, 2001; Schnarr *et al.*, 2006; Strle & Stanek, 2009; Tjisse-Klasen *et al.*, 2013).

A evolução clínica da BL é habitualmente dividido em três fases: doença/infeção localizada ou fase aguda, doença/infeção disseminada e doença tardia ou fase crónica (Kamradt, 2002; O'Connell, 2009; Meléndez *et al.*, 2014). No entanto, as manifestações clínicas podem não apresentar a referida sequência (Schnarr *et al.*, 2006).

1.6.1. Fase I - Infeção localizada (Fase Aguda)

Após a mordedura da carraça e inoculação das espiroquetas do complexo *B. burgdorferi* s.l. a manifestação clínica mais comum, (50 a 90% dos doentes) é o EM, que se caracteriza por uma erupção cutânea localizada, circular ou ovalada, vermelha ou rosa, que aparece após um período de incubação de 2-30 dias (geralmente entre os 5-15 dias) no local da mordedura. Uma das localizações mais comuns é nos membros inferiores. A erupção cutânea pode ser ligeira, com uma margem mais pronunciada que gradualmente migra de dentro para fora para produzir uma lesão de tamanho considerável (O'Connell, 2009; Meléndez *et al.*, 2014). Em média, apresenta um diâmetro de 10-16 cm e tende a ser maior quando localizado no tronco. No entanto, por definição, é necessário um diâmetro mínimo de 5 cm para se fazer o diagnóstico. Pode ser acompanhada por sintomas de gripe, tosse, rinite, sinusite, odinofagia, cefaleia e linfadenopatia local (Meléndez *et al.*, 2014).

Podem ocorrer múltiplas lesões de EM, que podem ser o resultado da disseminação sanguínea das bactérias, múltiplas mordeduras de carraças ou de disseminação local das espiroquetas. A apresentação múltipla varia de 4 a 20% e é mais comum nos EUA do que na Europa. De acordo com um estudo, nos Estados Unidos, apenas 25% dos doentes se recordam da mordedura da carraça antes das manifestações clínicas, pelo que este facto não exclui o diagnóstico de EM (Meléndez *et al.*, 2014).

Na Europa, o EM é a única manifestação clínica de BL que pode ser utilizada como base de diagnóstico da doença sem confirmação laboratorial (Stanek & Strle, 2003).

1.6.2. Fase II - Infecção Disseminada

A infecção disseminada é variável e as manifestações podem ocorrer a partir da primeira semana após a infecção ou passados alguns meses. É comum existirem períodos assintomáticos. Nesta fase as espiroquetas espalham-se pelo organismo o que pode afetar muitos tecidos, principalmente o sistema músculo-esquelético (60%), pele (20-25%), sistema nervoso (10%) e sistema cardiovascular (5%). Pode haver uma síndrome gripal com mialgias, artralgias, leve rigidez no pescoço, mas sem sintomas respiratórios significativos. Também podem ocorrer lesões múltiplas de EM (O'Connell, 2009; Meléndez *et al.*, 2014).

Durante esta fase pode ainda desenvolver-se a NB precoce. Estudos realizados na Europa, mostram que geralmente nesta fase aparecem manifestações ao nível do sistema nervoso periférico, onde se inclui a paralisia facial, que pode ser bilateral e principalmente radiculoneurite dolorosa, conhecida como síndrome de Bannwarth ou como síndrome de Garin-Bujadoux-Bannwarth, que pode ser acompanhada por uma meningite linfocítica. No que respeita à síndrome de Bannwarth, verifica-se que é comum na Europa ao contrário dos EUA, onde é rara. Quanto à NB precoce, esta quase sempre se apresenta como meningite linfocítica com ou sem paralisia facial. O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) apresenta-se como mielite, encefalite e até mesmo manifestações acidentais causadas por vasculite cerebral. Ainda na Europa o linfocitoma borreliano constitui uma apresentação rara e localizada, geralmente no lóbulo da orelha, mamilo ou escroto, podendo estar associado ocasionalmente à NB. Embora esta manifestação seja geralmente considerada como uma característica das fases II e III, pode desenvolver-se mais cedo (Schnarr *et al.*, 2006; O'Connell, 2009; Azevedo, 2015).

As complicações musculo-esqueléticas incluem artralgias persistentes. Apesar de poder acontecer na fase disseminada, a artrite de Lyme é geralmente uma manifestação da BL tardia, sendo que a inflamação recorrente das grandes articulações (geralmente afetando o joelho) pode tornar-se persistente sem antibioterapia. As alterações da condução cardíaca são, porém menos comuns (Schnarr *et al.*, 2006; Azevedo, 2015).

As manifestações oculares, hepáticas e outras, também já foram relatadas. É também comum existirem períodos assintomáticos (O'Connell, 2009; Meléndez *et al.*, 2014).

1.6.3. Fase III - Doença tardia (Fase Crónica)

A infeção não tratada durante um longo período de tempo pode atingir a terceira fase, que também é chamada doença crónica de Lyme (Azevedo, 2015).

Do ponto de vista dermatológico, a característica típica da infeção da fase III, na Europa, é a ACA, a qual está frequentemente associada à infeção por *B. afzelii*, podendo ocorrer meses ou anos após a mordedura da carraça. Observa-se tanto em homens como em mulheres, sendo uma condição rara nas crianças. A ACA é caracterizada por uma fase inflamatória marcada por placas cutâneas alargadas, edematosas, mal demarcadas, com uma descoloração vermelha-azulada nas extremidades distais, que eventualmente evoluem para lesões atróficas. Geralmente estão localizadas nas extremidades, mas também podem aparecer no tronco e raramente na face. Dos doentes com ACA, de acordo com alguns estudos, apenas cerca de 20% têm história prévia de EM, no entanto, muitos recordam-se de exposição a áreas florestadas e arborizadas (O'Connell, 2009; Bhate & Schwartz, 2011a; Azevedo, 2015).

A acrodermatite pode ser acompanhada por artralgia e neuropatia periférica. Apesar de raras são por vezes observadas outras manifestações como carcinoma de células escamosas e linfoma das células B da pele (Schnarr *et al.*, 2006; O'Connell, 2009).

A artrite de Lyme tardia, como anteriormente referido, é mais comum nos EUA do que na Europa, podendo ocorrer na fase disseminada ou na fase crónica. Segundo alguns autores cerca de 60% dos doentes não tratados, desenvolvem manifestações articulares meses a anos após a mordedura da carraça (Schnarr *et al.*, 2006; O'Connell, 2009). O curso clínico é geralmente intermitente, com episódios agudos de artrite e "remissões" aparentemente transitórias que podem se tornar mais curtas à medida que a doença progride, resultando numa artrite crónica. Na grande maioria dos casos, a artrite de Lyme toma um curso mono- ou oligo-articular, afetando principalmente as articulações dos joelhos, tornozelos e cotovelos. Os ombros e quadris também podem estar envolvidos (Schnarr *et al.*, 2006).

O diagnóstico da artrite com base nos sinais clínicos e laboratoriais de inflamação pode ser difícil, dado os mesmos serem pouco exuberantes (Schnarr *et al.*, 2006). Em alguns doentes, a inflamação continua por algum tempo após o tratamento com antibiótico. (O'Connell, 2009)

No que respeita à NB tardia, esta representa menos de 5% de todos os casos e dura entre seis meses a vários anos. Consiste em manifestações do sistema nervoso periférico (SNP), mais frequentemente de polineuropatia axonal, mas também de mononeuropatia e radiculopatia. Especialistas europeus estimam que a NB tardia ocorra em menos de um em cada 1000 indivíduos não tratados previamente (O'Connell, 2009; Azevedo, 2015).

As manifestações do sistema nervoso central (SNC) da NB tardia incluem vasculite cerebral, encefalomielite progressiva com comprometimento cognitivo, sintomas extrapiramidais, síndrome tetraspática, marcha espástica e micção perturbada (Azevedo, 2015).

Também os transtornos cardíacos da BL (cardite de Lyme), apresentam normalmente uma frequência relativa de 0,5%, ocorrendo geralmente dois meses após a mordedura da carraça e pode estar associada ao EM ou NB (Berglund *et al.*, 1995; Strle & Stanek, 2009).

As manifestações oculares são raras e desenvolvem-se principalmente na fase tardia da doença, podendo a fotofobia e dor ocular ser sintomas característicos da BL (Mikkila *et al.*, 2000).

Pode ser visto, no **Quadro 1**, as manifestações clínicas mais comuns da BL, assim como o espaço temporal em que é mais frequente a sua ocorrência.

Quadro 1- As três fases da Borreliose de Lyme e exemplos de manifestações clínicas

Fase de infecção	Manifestações e sintomas comuns	Espaço temporal	Exemplo
Infeção localizada	<p>EM</p> <p>Gripe, tosse, sinusite, rinite, dor de garganta, cefaleia.</p> <p>Linfoadenopatia local</p>	Dias a semanas	<p>EM</p> 
Infeção Disseminada	<p>Síndrome gripal</p> <p>EM dessiminado</p> <p>NB</p> <p>Paralisia facial</p> <p>Síndrome de Bannwarth</p> <p>Meningite linfocítica</p>	1ª semana a meses	<p>NB (paralisia de Bell)</p>
Doença tardia	<p>ACA</p> <p>Artralgias</p> <p>Neuropatia periférica</p> <p>Comprometimento neurológico</p>	Meses a anos	<p>ACA</p> 

1.7. Diagnóstico clínico

O diagnóstico da BL pode confundir muitos médicos e uma das maiores dificuldades é a sintomatologia ser muito semelhante, e por vezes até sobreponível, a outras doenças (Yannielli, 2004).

Para o diagnóstico da BL, há que ter em conta que esta é uma doença e enquanto tal existe uma disfunção do normal funcionamento de alguma parte do corpo, órgão ou sistema, manifestando-se através de sinais e sintomas clínicos. Ou seja, sem as manifestações clínicas não existe diagnóstico de BL, apenas pode ser provada uma infeção, que nem sempre causa doença. Sabe-se por exemplo, que nos EUA a população infetada com sintomatologia é superior à da Europa (Strle & Stanek, 2009).

Assim, um diagnóstico precoce da BL é importante porque quanto mais rápido for iniciado o tratamento, maior a probabilidade de uma total recuperação. O diagnóstico começa nas manifestações clínicas, histórico clínico e apoio laboratorial, recorrendo a técnicas quer serológicas quer moleculares (Monroe, 2001).

A manifestação típica, como já foi referido, é o EM o qual constitui a única manifestação clínica de BL que dispensa confirmação laboratorial, mas que pode ser confundida com uma infeção fúngica, principalmente se os locais da lesão forem a zona inguinal e/ou axilar. Outros sintomas de BL embora fortemente sugestivos como é o caso da ACA, da síndrome de Bannwarth ou linfocitoma borreliano, necessitam de suporte laboratorial para o diagnóstico definitivo (Stanek & Strle, 2003; Strle & Stanek, 2009). O diagnóstico diferencial inclui, assim, linfoma cutâneo, sarcoidose, sarcoma de Kaposi, granuloma anular, celulite, foliculite, dermatite/eczema de contacto, urticária, outras reações por picadas de artrópodes e ainda situações de etiologia parasitária (Strle & Stanek, 2009; Meléndez *et al.*, 2014).

1.8. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da BL pode ser feito utilizando métodos diretos, sendo os principais a cultura a partir de um fluido biológico e a reação da polimerase em cadeia (PCR). Pode também ser realizado através de métodos indiretos por: Imunofluorescência Indireta (IFI ou IFA), *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e *Western Blot* (WB). Estes apresentam-se como ferramentas mais acessíveis para o diagnóstico (Busson

et al., 2012; Marques, 2015). Por esse motivo, desde 1995 o CDC, assim como mais tarde o seu congénere europeu, o ECDC, recomenda que o diagnóstico laboratorial englobe dois testes (**Figura 8**). O primeiro procedimento consiste num ensaio imunoenzimático, por ELISA ou por IFA. Se este primeiro passo for negativo, nenhum teste adicional da amostra é recomendado, exceto quando há uma forte e marcada evidência epidemiológica de contacto do doente com o íxodídeo. No entanto, se esta primeira abordagem for positiva ou indeterminada (algumas vezes chamada "ambígua"), deve realizar-se o teste confirmatório, teste de *imunoblot* - *Western Blot*. Os resultados são considerados positivos se o teste de *WB* for positivo independentemente do resultado dos testes anteriores. Do ponto de vista molecular, quando o teste é positivo, isso aponta claramente para Borreliose de Lyme, quando numa amostra biológica do doente [biópsia, sangue, soro, líquido céfalo-raquidiano (LCR)] é detetado DNA de *B. burgdorferi* s.l. (CDC, 2015).

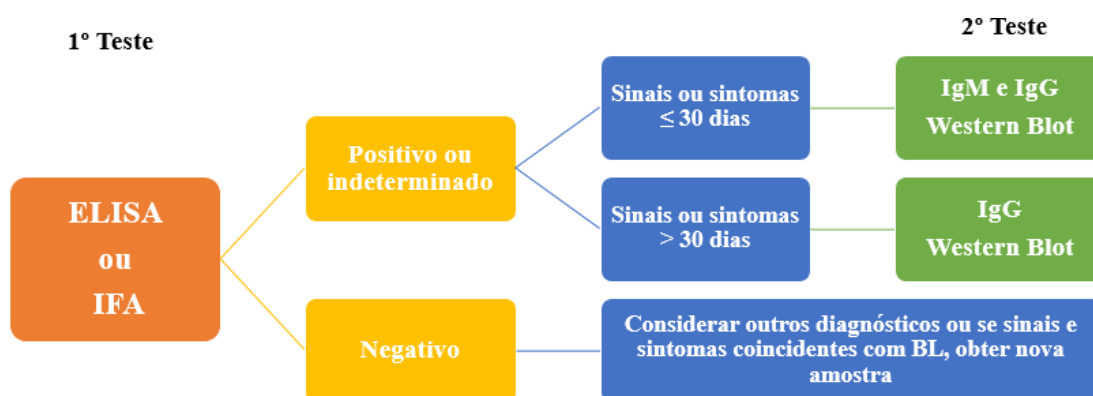


Figura 8 – Recomendações atuais do CDC para o diagnóstico serológico de Borreliose de Lyme (*Adaptado de:* CDC, 2015).

1.8.1. Métodos indiretos

Como mencionado anteriormente, as recomendações do CDC e ECDC referem que devem ser realizados testes de IFA ou ELISA como testes de *screening* (rastreamento) (CDC, 2015).

A técnica de IFA, permite a observação da reação antígeno-anticorpo entre os anticorpos anti *B. burgdorferi* s.l. presentes no soro ou LCR e os antígenos fixos na lâmina (i.e., as

próprias borrélias). A presença de anticorpos é detetada através de microscópio de fluorescência (**Figura 9**) (Aguero-Rosendeld *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2014).

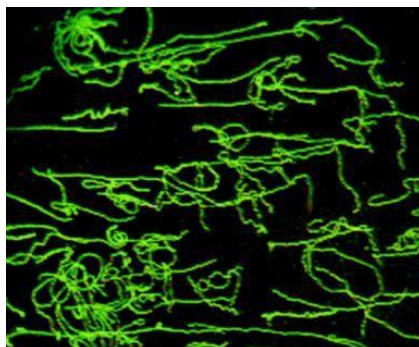


Figura 9 - Microfotografia de uma reação de imunofluorescência (IFA) positiva (ampliação 1000x) (fotografia original do autor).

As limitações deste ensaio incluem além da necessidade de microscopia de fluorescência e de profissionais bem treinados, também a subjetividade envolvida na leitura e interpretação da fluorescência assim como a possibilidade de existência de reações cruzadas (**Quadro 2**) (Aguero-Rosendeld *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2014).

Quadro 2 - Infecções e doenças associadas a reações cruzadas nos testes serológicos para Borreliose de Lyme (Fonte: Adaptado de Murray *et al.*, 2014)

- Infecção por *Treponema pallidum*
- Infecção por espiroquetas orais
- Infecção por outras espécies de *Borrelia*
- Artrite reumatoide juvenil
- Artrite reumatoide
- Lúpus eritematoso sistêmico
- Mononucleose infecciosa
- Endocardite bacteriana subaguda

A técnica de ELISA é efetuada a partir de soro ou LCR diluído, este é incubado em microplacas revestidas com um antígeno (no caso, lisado de borrélias). Os anticorpos específicos ligam-se ao antígeno e os anticorpos não ligados são removidos por lavagem. Em seguida, são adicionados anticorpos ligados a enzimas secundárias. Após a remoção de anticorpos secundários não ligados, é adicionado o substrato para a enzima e é produzido um sinal visível que é mensurável e associado com a concentração de

anticorpos do doente para o antígeno investigado. É uma técnica mais adequada para testes em grande escala e elimina a necessidade de interpretação subjetiva. No entanto, uma limitação importante desta técnica em termos da detecção de anticorpos anti *B. burgdorferi* s.l. é a falta de padronização. Existem variações entre os ensaios em termos de composição antigénica e a detecção de classes de imunoglobulinas específicas. Tais variações podem ocorrer entre kits comerciais diferentes, bem como entre lotes do mesmo kit (Aguero-Rosenfeld *et al.*, 2005; Tjernberg, 2011).

Por último, a técnica *WB* é mais sensível e específica e por esse motivo funciona como técnica confirmatória. Na Europa, o *WB* deve ser utilizado e interpretado de forma criteriosa devido à heterogeneidade das estirpes infecciosas de várias espécies de *Borrelia* (Bhate & Schwartz, 2011b). As proteínas antigénicas presentes nas tiras de nitrocelulose (**Figura 10**), portadoras de antígeno são incubadas com soro problema (soro do doente) e os anticorpos específicos do antígeno podem ligar-se aos respetivos antígenos. Estes anticorpos ligados podem ser visualizados de uma forma semelhante à do teste ELISA. Estas tiras podem formar vários padrões de bandas dependendo de quais anticorpos específicos do antígeno presentes (Tjernberg, 2011).

Após uma infeção, os anticorpos persistem frequentemente por meses ou anos. Como resultado, os testes sorológicos não distinguem com precisão a infeção ativa da infeção passada. A taxa global de falsos positivos dos testes de BL é de aproximadamente 5% (Bratton, *et al.*, 2008).

A exposição recente, uma nova exposição ou uma doença recorrente podem fazer com que este teste seja positivo. Assim um teste *Western Blot* - IgM pode ser positivo uma semana após a mordedura de carraça e permanece geralmente positiva durante seis a oito semanas após a exposição inicial (Bhate & Schwartz, 2011b). A interpretação segue os critérios padronizados pelo CDC, que requer duas das três bandas da tira de teste para um *WB* - IgM positive, e cinco de dez bandas (da tira de teste) para um *WB* - IgG positive. Mas cada vez mais estes testes são mais sensíveis e presentemente utilizam proteínas recombinantes, pelo que a interpretação deve seguir rigorosamente os critérios dos fabricantes para uma correta interpretação. Estas recomendações aplicam-se sobretudo à infeção adquirida nos EUA, uma vez que outras espécies dentro do complexo *B. burgdorferi* s.l. podem causar doença na Europa e na Ásia (Marques, 2015).

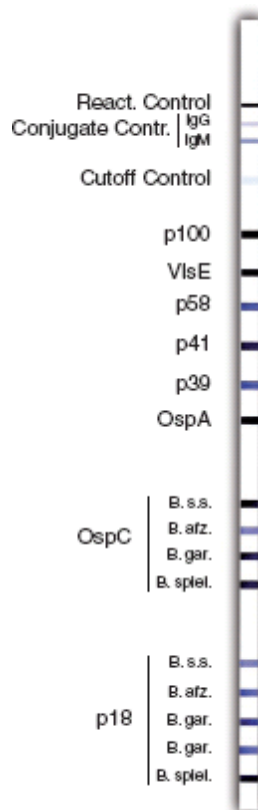


Figura 10 - Representação de um “blot” (membrana de nitrocelulose) com antígenos recombinantes purificados de *B. burgdorferi* s.l. usados em WB (Fonte: Mikrogen®).

No entanto, a metodologia WB é limitada pela falta de padronização da fonte de antígenos, pela leitura visual e interpretação subjetiva da intensidade da banda, o que pode levar a falsas leituras positivas, assim como pelo seu custo e ainda a variabilidade da resposta de anticorpos em doentes com a mesma manifestação clínica de BL (Aguero-Rosenfeld *et al.*, 2005). Os critérios de interpretação desta técnica variam entre a América do Norte e a Europa, podendo ainda variar entre diferentes regiões da Europa, o que fica a dever-se à grande diversidade de espécies genómicas patogénicas para humanos, atualmente presente na Europa, em contraste com a única espécie de *B. burgdorferi* s.l. existente nos EUA (Tjernberg, 2011).

1.8.2. Métodos diretos

A cultura de borrelíias, caracteriza-se por ser uma técnica fastidiosa, pois deve ser realizada no meio seletivo BSK ou variantes do mesmo, conforme já foi referido (1.4.2 O agente – bactérias do complexo *B. burgdorferi* s.l.). A cultura é considerada o *gold*

standard já que apresenta uma especificidade muito próxima dos 100%, porém a sua sensibilidade é relativamente baixa (Santos, *et al.*, 2010). O isolamento pode demorar de 12 semanas a um ano, embora a maioria das culturas possam ser positivas em uma semana. As espiroquetas podem ser visualizadas utilizando microscopia de campo escuro ou contraste de fase (CFSPH, 2011).

Por sua vez, a técnica de PCR permite a detecção de sequências de ácidos nucleicos de *Borrelia* spp., com elevada especificidade, porém com uma sensibilidade variável (20% a 81%). É uma técnica útil para a confirmação da infecção por *Borrelia*, particularmente no líquido sinovial de doentes com artrite de Lyme e também em casos de incerteza de diagnóstico, mas geralmente é realizada apenas para fins de investigação. Em 2008, Cerar e colaboradores, demonstraram que a *nested*-PCR, utilizando o gene *fla*, apresentava uma maior sensibilidade do que a PCR convencional (64,6% vs 24%) (Santos *et al.*, 2007; Cerar *et al.*, 2008; Borchers *et al.*, 2015).

Tem sido utilizada, uma grande variedade de métodos moleculares, mas não estão padronizados, uma vez que os protocolos e alvos genéticos variam entre os laboratórios e são necessárias mais validações clínicas. Também para esta técnica, os resultados negativos não excluem o diagnóstico de BL (Rizzoli *et al.*, 2011; Borchers *et al.*, 2015).

1.9. Indivíduos assintomáticos

O termo infecção assintomática para a BL é utilizado quando o indivíduo que é exposto a espiroquetas da espécie *B. burgdorferi* s.l., possui anticorpos IgG no soro, mas não tem diagnóstico de BL prévio conhecido. O facto de alguns indivíduos poderem ser expostos a estas bactérias, sem desenvolverem sintomas clínicos desperta interesse do ponto de vista imunológico e poderá indicar uma resposta imune mais eficaz às espiroquetas nestes indivíduos. Verificou-se que indivíduos assintomáticos têm uma maior secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-12 e TNF do que doentes com manifestações clínicas de BL, sugerindo uma atividade inata melhorada. Quanto à resposta imune adaptativa, não foram encontradas diferenças na secreção de IFN- γ e IL-4 específica de *Borrelia* quando comparados adultos assintomáticos expostos com *Borrelia* com doentes com BL clínica (Skogman *et al.*, 2012).

Estudos epidemiológicos em áreas com BL endêmica revelaram que a reatividade de anticorpos contra *B. burgdorferi* s.l. não é incomum em indivíduos saudáveis que não se lembram de ter qualquer sinal ou sintoma de infecção por BL. No entanto, a seroconversão parece ser menos comum nos EUA do que na Europa. Os mecanismos subjacentes que determinam se um indivíduo desenvolve seroconversão assintomática ou doença clínica são na sua maioria desconhecidos. A capacidade invasiva variável de diferentes estirpes de borrelíias tem sido proposta, bem como diferenças inter-individuais na resposta imune contra *B. burgdorferi* s.l. (Henningsson, 2011).

Esta problemática pode ser importante no âmbito da hemotransfusão. Apesar da presença de anticorpos anti-*B. burgdorferi* em doadores de sangue de regiões endêmicas, não têm sido reportados casos de transmissão da BL por transfusão sanguínea. No entanto, existem casos de cultura positiva de *B. burgdorferi* no sangue de doentes com BL inicial, o que desde então deixou um alerta à comunidade médica para uma possível transmissão através de transfusão sanguínea (Linden & Bianco, 2001; Halperin, J.J., 2011).

Em 1989, foi realizado um estudo realizado por Boden e colaboradores onde foi possível verificar a sobrevivência de *B. burgdorferi* em componentes sanguíneos (plasma, plaquetas e eritrócitos) dos doadores de sangue, que estavam em diferentes condições ambientais (-20°C-24°C) (Linden & Bianco, 2001).

Tendo em conta que o sintoma mais comum (EM) pode ser causado na sequência da mordedura da carrapa, uma transmissão intravenosa, possivelmente passaria despercebida, até pelos sintomas não específicos da BL (Linden & Bianco, 2001).

Num estudo realizado em doadores de sangue na Malásia, estes foram testados para os anticorpos anti *B. burgdorferi* (espécie *B. afzelii*) para IgM e IgG, tendo se verificado que apenas um dos doadores revelou resultado positivo para BL (Tay *et al.*, 2002).

1.10. Tratamento

O tratamento é iniciado após a confirmação do diagnóstico, o que deve acontecer o mais precocemente possível. A terapia profilática, não é recomendada nos casos assintomáticos, mas o indivíduo deve ficar atento aos seus sintomas clínicos, tais como, presença de rash, febre ou artralgia (Junior *et al.*, 2007).

As espiroquetas do complexo *B. burgdorferi* s.l., são suscetíveis a penicilinas, cefalosporinas de segunda e terceira geração, tetraciclina, macrólidos e glicolípidos, mas são resistentes a aminoglicosídeos, ao trimetoprim, à rifampicina e às quinolonas (Wormser *et al.*, 2006).

A escolha do agente antibacteriano, bem como a duração do tratamento e via de administração, tem por base a fase da doença e os órgãos envolvidos, com auxílio dos testes laboratoriais (Stanek *et al.*, 2012; Gerstenblith & Stern, 2014). A antibióterapia é administrada por via oral ou via endovenosa, dependendo da fase da doença (Junior *et al.*, 2007). Em caso da infecção localizada, o tratamento indicado é a doxiciclina, cefuroxima ou amoxicilina, por via oral, geralmente durante 14 a 21 dias. No caso das manifestações clínicas apresentadas corresponderem a doença/infecção disseminada, como miocardite leve ou uma paralisia facial, os agentes antimicrobianos a utilizar são os mesmos, diferindo apenas na duração do tratamento, cerca de 28 dias (Gerstenblith & Stern, 2014).

No que respeita ao envolvimento neurológico e cardíaco é indispensável a administração por via endovenosa de ceftriaxona, por um período entre duas a quatro semanas. No entanto, após a resolução do bloqueio cardíaco, deverá passar a ser administrado por via oral (Gerstenblith & Stern, 2014).

Quando há manifestações cutâneas ou início da artrite de Lyme, os antibióticos recomendados são doxiciclina, amoxicilina, cefuroxima e fenoximetilpenicilina (penicilina V) administradas por via oral (Wormser *et al.*, 2006).

Existem estudos que indicam que o tratamento com ceftriaxona por via endovenosa durante cerca de 21 dias é suficiente no tratamento da BL disseminada (Oski *et al.*, 2007). Um outro estudo realizado por Bremell e Dotevall, em 2014, demonstrou a eficácia da doxiciclina por via oral em casos de NBL, independentemente da gravidade dos sintomas (Bremell & Dotevall, 2014).

Importa ainda referir, que a síndrome pós-doença de Lyme pode ocorrer. Esta caracteriza-se por persistência de múltiplos sintomas tais como, fadiga, cefaleias, mialgias, artralhas, comprometimento cognitivo e distúrbios de memória após tratamentos sucessivos.

Geralmente os sintomas são leves, sendo que em alguns casos podem ser graves e incapacitantes, interferindo na qualidade de vida do indivíduo. Nestes casos, o tratamento recomendado é sintomático, geralmente sem recurso a antibioterapia (Schnarr *et al.*, 2006; Junior *et al.*, 2007).

1.11.Objetivos

O estado de arte e os poucos estudos até agora realizados neste âmbito, motivaram a presente investigação, com a qual se pretendeu abordar a temática dos indivíduos assintomáticos e a sua importância no contexto hemotransfusional. Dentro desta perspectiva, o presente estudo teve como principais objetivos:

- Identificar os indivíduos com anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* s.l. (IgM e IgG) numa amostra populacional assintomática;
- Identificar os indivíduos com resultados positivos através do teste confirmatório (*Western Blot*);
- Relacionar a presença de anticorpos específicos para Borreliose de Lyme com as características socio demográficas, clínicas, de viagens realizadas e fatores de risco para infeção no grupo populacional estudado.

AMOSTRA POPULACIONAL E MÉTODOS

2. AMOSTRA POPULACIONAL E MÉTODOS

2.1. Tipo de Estudo

Realizou-se um estudo descritivo, exploratório de secção transversal.

2.2. Amostragem

Os participantes (voluntários) foram recrutados de entre os utentes que recorreram ao laboratório do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), que realizaram estudo analítico.

A amostragem foi não aleatória, por conveniência.

Foram convidados a participar no estudo todos os indivíduos que viessem fazer análises de sangue ao IHMT/LABCLIN, sem sintomatologia ou indicação clínica para BL, durante os meses de setembro a dezembro de 2016. Foram também convidados a participar neste estudo, alunos, professores e funcionários do IHMT.

Os critérios de inclusão requeridos para este estudo foram:

- i) ter idade igual ou superior a 18 anos;*
- ii) ter capacidade para entender o estudo;*
- iii) assinar o consentimento informado.*

Os critérios de exclusão para a participação neste estudo foram:

- i) história pessoal de doenças pré-existentes, como febre reumática, artrite reumatoide, espondilartrite anquilosante, mononucleose infecciosa e sífilis*
- ii) não cumprir os critérios de inclusão.*

2.3. Instrumento de colheita de dados

Para a recolha de dados foi necessário a assinatura do consentimento informado (Anexo I) por parte dos participantes do estudo. De seguida foi aplicado um questionário - Questionário I - onde foram colocadas questões relacionadas com a existência das doenças pré-existentes mencionadas acima - critérios de exclusão (Anexo II).

Além do Questionário I que permitiu verificar se os participantes tinham algum fator de

exclusão, não lhes permitindo participar no estudo, foi também realizado outro questionário - Questionário II - elaborado para obter informações complementares do participante, como: características sociodemográficas, as atividades/fatores de risco para infecção, as manifestações clínicas/sintomatologia (Anexo III). Os dois questionários aplicados foram auto preenchidos.

2.4. Amostras biológicas

Para a avaliação serológica foram colhidas amostras de sangue, dos utentes que consentiram participar no estudo.

Após separação do soro, todas as amostras dos participantes foram submetidos à técnica de IFA; as amostras com resultado positivo ou duvidoso (i.e., *borderline*), foram posteriormente confirmadas pelo teste de *Western Blot* (WB ou “*immunoblot*”).

2.5. Meio de cultura e condições de crescimento

Para a realização do presente trabalho, foi de extrema importância o meio de cultura para o crescimento adequado das bactérias do complexo *B. burgdorferi*. O seu desenvolvimento *in vitro* teve como objetivo a preparação de antígenos monovalentes para a técnica de imunofluorescência indireta (IFA). Com o intuito de se obterem culturas densas (10^7 e 10^8 bactérias/mL) foram feitas “passagens” de estirpes conservadas a -70°C , em meio seletivo líquido BSK-H (SIGMA®). Foram inoculados em tubos estéreis com 5 mL, cerca de 12 gotas (1gota = 33 μL) de “passagens” recentes de cada uma das estirpes com a densidade já referida. As culturas foram incubadas a 34°C .

Foi feita uma avaliação diária, quanto à presença e/ou ausência de crescimento bacteriano por observação macroscópica de cada tubo de cultura. O crescimento demorou cerca de 5- 7 dias, onde pôde observar-se à medida que os dias passaram a mudança de cor do meio de vermelho para amarelo translúcido.

Por microscopia de fundo escuro foi feita a confirmação do crescimento bacteriano. Os tubos de cultura foram conservados a 4°C para posterior utilização nas diversas fases deste trabalho.

2.6. Diagnóstico imunológico

De acordo com as instâncias internacionais, a abordagem diagnóstica para a BL deve ser feita por uma avaliação “two-step”. Esta consiste na realização da técnica de imunofluorescência indireta (IFA) como teste de rastreio, sendo as amostras com resultado positivo (título $\geq 1/256$) e duvidoso (título 1/128) posteriormente confirmadas pelo teste de *Western Blot* (WB).

2.6.1. Técnica de imunofluorescência indireta (IFA)

Para a realização desta técnica é necessário que ocorra primeiramente a preparação do antígeno para as lâminas de IFA. Este é produzido no laboratório LBL (Leptospirose e Borreliose de Lyme) do IHMT a partir de culturas das estirpes de referência Pbi (*B. garinii*). A preparação das lâminas foi feita segundo os protocolos utilizados no laboratório de LBL, que advém do método descrito em 1992, por Gill & Johnson (Gill & Johnson, 1992).

Inicialmente, foram centrifugados 50 mL de Pbi, com densidade $\geq 10^7$ bactérias/mL, durante 25 minutos, com velocidade de 13000 rpm, a uma temperatura de 15°C. Após a primeira centrifugação, o sedimento obtido é ressuspenso em igual volume de tampão salino de sódio (PBS) 0,01 M (pH~7,2), com agitação no vortex. É realizada uma segunda centrifugação a 13000 rpm, durante 20 minutos a 15°C. Repetindo-se o processo da primeira centrifugação, com o sedimento obtido, seguindo-se uma terceira e última centrifugação a 10°C, durante 15 min a uma velocidade de 12000 rpm. Do sedimento obtido foi feita nova suspensão em 1 mL de tampão PBS 0,01 M (pH~7,2), com agitação no vortex, obtendo-se assim o lisado antigénico total.

De acordo com a densidade observada, foi escolhida a diluição (1:20; 1:40; 1:80; 1:100) a utilizar para a preparação das lâminas. Esta deve garantir uma distribuição homogênea do antígeno nas lâminas. Foi feita uma lâmina "teste", para observação microscópica. Após a observação em microscopia de fundo escuro, não foi realizada qualquer diluição, para não comprometer a qualidade das lâminas.

Distribuíram-se 5 μ L do antígeno em cada poço das lâminas, deixando-as secar à temperatura ambiente. As lâminas foram depois colocadas numa tina com acetona durante

10 minutos, sob agitação, de modo a fixar o antígeno nos diversos poços. Em seguida foram realizadas duas lavagens com água destilada (10 minutos cada) igualmente sob agitação.

Foram preparadas 150 lâminas. Após secarem na câmara de fluxo laminar, foi visualizada uma lâmina escolhida aleatoriamente, em microscópio de fluorescência (Motic®), aferindo-se assim a sua qualidade. Posteriormente foram devidamente acondicionadas a -20°C, para serem usadas no presente trabalho e na rotina do laboratório.

A observação das lâminas foi feita num microscópio de fluorescência (Motic®), usando um filtro com um comprimento de onda entre 450 e 490 nm e utilizando a objetiva de imersão.

Se o soro a testar possuir anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* s.l., estes vão reagir com o antígeno fixado na lâmina – reação antígeno-anticorpo – sendo emitida fluorescência verde.

Cada amostra de soro testada foi diluída a 1:32; 1:64; 1:128 e 1:256. Para o controlo positivo e negativo, foram realizados os mesmos procedimentos. São consideradas amostras com resultado positivo quando o título é igual ou superior a 1:256 e duvidoso as amostras com título igual a 1:128. Assim, os resultados foram expressos pelo título mais elevado dos soros diluídos para o qual a fluorescência foi observada.

2.6.2. Técnica de Western Blot (WB)

Todas as amostras positivas e duvidosas, foram submetidas ao teste confirmatório por WB. Para a realização desta técnica foram utilizados os kits comerciais, da Mikrogen®: "recomLine Borrelia IgM" e "recomLine Borrelia IgG".

Esta técnica consiste num método indireto qualitativo *in vitro*, para a deteção de anticorpos IgG ou IgM anti- *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. bavariensis* e *B. spielmanii* em soro, plasma ou LCR.

O teste *recomLine* Borrelia IgM e IgG, baseia-se em antígenos recombinantes altamente purificados de *B. burgdorferi* s.l. (OspA, OspC, p100, VlsE, p39, p58, p18, p41) que são fixados em tiras de teste de nitrocelulose.

As tiras de teste são incubadas com as amostras de soro diluídas. Se existirem anticorpos específicos, isto é, anticorpos anti-*B. burgdorferi* s.l. ocorrerá uma reação antígeno-anticorpo. Os anticorpos que não se ligam aos antígenos são eliminados durante a lavagem das tiras. Numa segunda etapa as amostras são sujeitas a uma nova incubação, desta vez com anticorpos anti-imunoglobulina humana (IgM e IgG), conjugadas com uma enzima, a peroxidase. Segue-se nova lavagem, onde os anticorpos não ligados ao conjugado, são eliminados. A etapa final requer a aplicação do substrato, que após alguns minutos permite a visualização da reação colorimétrica catalisada pela peroxidase, permitindo a observação macroscópica de bandas na tira de teste que traduzem a detecção de anticorpos específicos ligados.

Para a validação do teste, deve verificar-se a presença da banda controlo IgM ou IgG. A partir daí deve ser feita a leitura das restantes bandas de acordo com a intensidade da banda do controlo "*cut-off*". Apesar de ser um teste qualitativo, os fabricantes do kit atribuem um valor quantitativo a cada uma das bandas, variando o valor no caso da tira ser IgM ou IgG. Possuem um valor mais elevado as proteínas consideradas *major* no diagnóstico de BL.

2.7. Operacionalização de variáveis

Foi necessária proceder à operacionalização das variáveis de forma a obter uma correta recolha de dados, análise e interpretação dos mesmos (**Quadro 3**).

Quadro 3 - Variáveis socio demográficas e clínicas do estudo e as suas definições

Variáveis socio demográficas e de risco de infeção	
Género	género (masculino ou feminino)
Idade	Anos
Classe etária	classe de idades, segundo os <i>Censos 2011</i> da população ativa portuguesa, dos indivíduos deste estudo: 20-24 anos, 25-29 anos, 30-34 anos, 35-39 anos, 40-44 anos, 45-49 anos, 50-54 anos, 55-59 anos, 60-64 anos, 65-69 anos, 70-74 anos, ≥ 75 anos.
Nacionalidade	indica se os indivíduos nasceram em Portugal, outros países da Europa, em África, na América do Sul ou na Ásia
Profissão	atividade profissional (Ativa, Reformado, Desempregado, Estudante);
Profissão de risco	profissões consideradas de risco [Caçador (a), agricultor (a), Jardineiro (a)]
Carraça no corpo	visualização prévia de carraça no corpo
Mordedura de carraça	mordedura prévia de carraça
Há quanto tempo	corresponde ao tempo decorrido em anos que o participante foi mordido por carraça
Estadia em área florestada	indica se os indivíduos deste estudo vivem, viveram ou passaram temporadas em zonas de área florestada;
Viveu quando	tempo decorrido desde a última estadia
Cães	indica se os participantes deste estudo tiveram ou têm cães
Outro contacto com cães	contacto com cães

Fora de Portugal	estadia fora de Portugal
Zona de risco Portugal	zonas de risco em Portugal de contrair BL, por onde os indivíduos deste estudo passaram;
Zona de risco	zonas de risco no Mundo, por onde os indivíduos deste estudo passaram
Zona endémica	zonas endémicas no Mundo, por onde os indivíduos deste estudo passaram
Caça	ter como atividade de lazer a caça
Agricultura	ter como atividade de lazer a agricultura
Jardinagem	ter como atividade de lazer a jardinagem
Campismo	ter como atividade de lazer o campismo
Caminhadas área florestada	ter como atividade de lazer caminhar em áreas florestadas
Caminhadas área arborizada	ter como atividade de lazer caminhar em áreas arborizadas
Outras	outras atividades com contacto com a natureza
Variáveis clínicas	
Pápula	pápula [elevação pequena da pele (menos de 1cm) rosada ou avermelha], nos dois anos antecedentes ao estudo
Febre	diagnóstico de febre (superior a 39°C) nos dois anos antecedentes ao estudo
Artrite	diagnóstico de artrite nos dois anos antecedentes ao estudo

Miocardite	diagnóstico de miocardite nos dois anos antecedentes ao estudo
Pericardite	diagnóstico de pericardite nos dois anos antecedente ao estudo
Paralisia	diagnóstico de paralisia nos dois anos antecedentes ao estudo
Mancha avermelhada	mancha avermelhada na pele em forma oval nos dois anos antecedentes ao estudo
Doença de Lyme	indica se o indivíduo já teve ou tem a doença de Lyme
IFA	presença ou não de anticorpos anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. no soro dos participantes
WB IgM	presença ou não de anticorpos IgM anti- <i>B. burgdorferi</i> s.l. no soro dos participantes
WB IgG	presença ou não de anticorpos IgM anti- <i>B. burgdorferi</i> s.l. no soro

2.8. Tratamento dos dados

As variáveis utilizadas para este estudo foram as características sociodemográficas, as atividades/fatores de risco para infecção, as manifestações clínicas/sintomatologia e os resultados laboratoriais - teste IFA e WB IgM e WB IgG.

Tratando-se de um estudo descritivo, a análise dos dados nesta Dissertação, é apresentada em tabelas (tabela de frequências) e gráficos, pretendendo-se mostrar as frequências absolutas e relativas das variáveis em estudo obtidas através do questionário aplicado e dos resultados laboratoriais.

O tratamento estatístico de dados foi elaborado utilizando o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versão 24.0.

2.9. Considerações éticas

Foi solicitada autorização ao responsável do Laboratório Central que apoia as consultas do IHMT, para a realização do estudo.

O estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética do IHMT (parecer nº 12-2016) e pela Comissão Nacional de Proteção de Dados.

O questionário era anónimo, dele constando apenas um número de código entre o questionário e as amostras colhidas, pelo que apenas a investigadora (Mestranda) conhecia a correspondência (participante – código).

Foi respeitada a confidencialidade e todos os indivíduos podiam desistir do estudo a qualquer momento.

Os indivíduos que tivessem teste confirmatório positivo seriam contactados pela investigadora (Mestranda).

Não existiram conflitos de interesse.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da população em estudo

Caraterísticas sociodemográficas

Participaram neste estudo 129 indivíduos. Os resultados são apresentados em tabelas de frequência, gráficos e também medidas de tendência central nas variáveis contínuas da amostra.

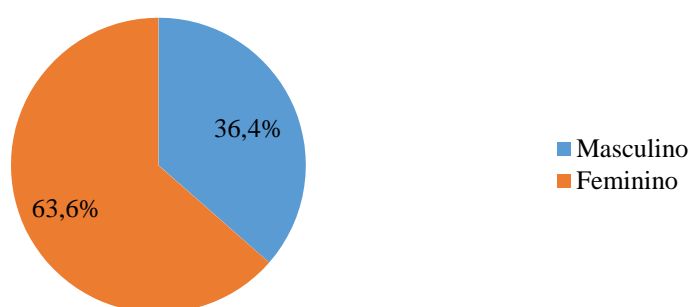


Figura 11- Distribuição percentual dos participantes do estudo por gênero.

Como pode ser observado na **Figura 11**, a maioria dos participantes deste estudo eram do gênero feminino, 63,6% (82/129) enquanto o gênero masculino contou com 47 participantes (36,4%).

A distribuição da idade dos participantes do estudo, pode ser observado no **Quadro 4**, onde se constata que o participante mais novo deste estudo tinha 21 anos e o mais velho 91 anos. A média de idades dos participantes foi de 53 anos com um desvio padrão de 21,385 o que significa uma grande variabilidade no que respeita à amostral em estudo.

Quadro 4 - Medidas de tendência central para a variável “idade” dos participantes do estudo

Frequência (n)	127/129
Mínimo	21 anos
Máximo	91 anos
Média	53 anos
Desvio padrão	21,385
Percentil	25: 30 anos 50: 54 anos 75: 73 anos

De referir ainda que a frequência para a variável “idade” foi de 127 indivíduos, visto que dois dos participantes não responderam a esta questão.

A amostra em estudo foi dividida em diversas faixas etárias, tendo sido categorizada da seguinte forma: 20-24 anos, 25-29 anos, 30-34 anos, 35-39 anos, 40-44 anos, 45-49 anos, 50-54 anos, 55-59 anos, 60-64 anos, 65-69 anos, 70-74 anos e ≥ 75 anos, cuja distribuição pode ser observada na **Figura 12**.

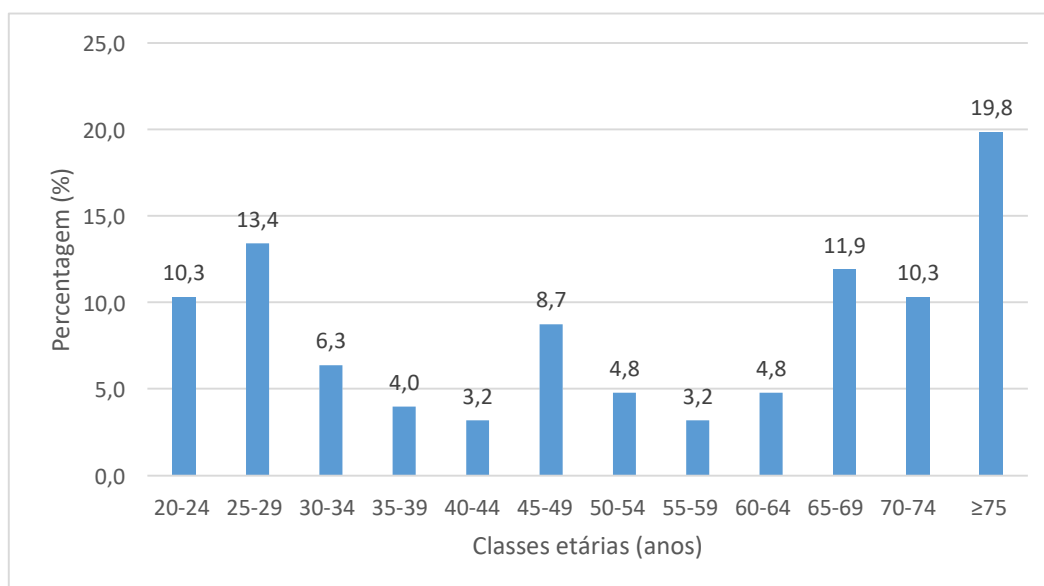


Figura 12 - Distribuição dos participantes do estudo por classes etárias (classe de idades).

É possível observar que o grupo etário que apresenta uma maior frequência foi ≥ 75 anos, 25/127 (19,8%). A segunda classe de idades mais representada foi a dos 25-29 anos, com uma frequência de 17/127 (13,4%). As classes de idades menos representadas neste estudo, foram as de 40-44 anos e 55-59 anos ambas com apenas 4/127 (3,2%).

No que respeita à variável “nacionalidade” consideraram-se quatro categorias distintas: Portugal, Europa, África, América do Sul e Ásia (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Tabela de frequências dos participantes do estudo quanto à “nacionalidade”

	Frequência (n)	Percentagem (%)
Portugal	110	85,3
Europa	4	3,1
África	12	9,3
América do Sul	2	1,6
Ásia	1	0,8
Total	129	100

Pode observar-se pela **Tabela 1**, que a maioria dos participantes deste estudo nasceram em Portugal, 110/129 (85,3%). O continente Africano foi a segunda categoria com mais participantes 12/129 (9,3%).

Quanto à atividade profissional, esta foi categorizada em: Ativo, Desempregado, Reformado e Estudante. A quem não respondeu a esta pergunta no questionário, foi atribuída a designação NS/NR (Não sabe / Não responde) (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Distribuição dos participantes de acordo com a “variável” atividade profissional

Atividade profissional	Frequência (n)	Percentagem (%)
NS/NR	2	1,6
Ativo	64	49,6
Desempregado	2	1,6
Reformado	49	38
Estudante	12	9,3
Total	129	100

Verifica-se que a maioria da população em estudo (49,6%) era profissionalmente ativa, seguida da população reformada com (38%) do total de participantes. Os estudantes e os desempregados foram as populações com menor expressão neste estudo, com (9,3%) e (1,6%) de participantes, respetivamente.

Fatores de risco

Relativamente à variável “profissão de risco” para contrair Borreliose de Lyme, esta foi categorizada em: Agricultor, Jardineiro, Caçador, Sem profissão de risco e ainda, Agricultor/Jardineiro em simultâneo (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Tabela de frequências da variável “profissão de risco” da amostra populacional do estudo, face à BL

Profissão	Frequência (n)	Percentagem (%)
Agricultor	3	2,4
Jardineiro	2	1,6
Caçador	1	0,8
Sem profissão de risco	119	93,7
Agricultor/Jardineiro	2	1,6
Total	127	100

A maioria da população do estudo (93,7%), não reportou ter nenhuma profissão de risco no âmbito da BL. Apenas um indivíduo referiu a caça, como atividade/profissão de risco.

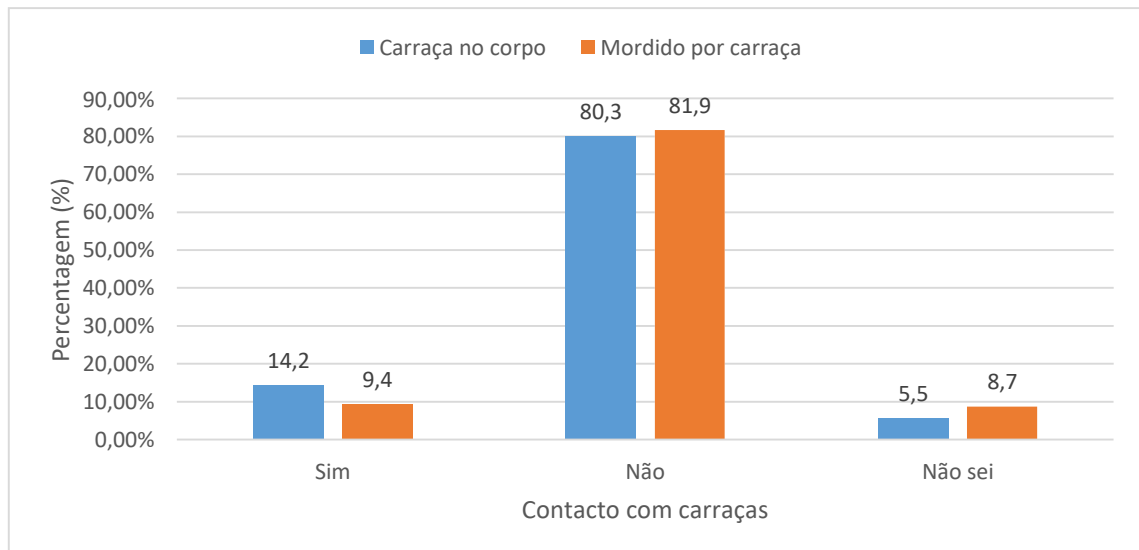


Figura 13 - Representação gráfica da distribuição da população em estudo de acordo com o contacto com carraças reportado

Foi criado um gráfico, a partir das variáveis “Carraça no corpo” e “Mordido por carraça”, denominada “Contacto com carraças”

Pela observação da **Figura 13**, pode constatar-se o contacto com carraças relatados pelos participantes deste estudo. Verificou-se que 18 indivíduos do total de participantes tiveram contacto com a carraça no seu corpo, sendo que 12 (9,5%) recordam-se da mordedura da mesma. Tendo em conta, que na maioria dos casos de BL, os doentes não se recordam de ter tido nenhum contacto com carraças, estes números podem ser superiores (viés de memória).

O mesmo procedimento foi efetuado para as variáveis “Ter cão” e “Contacto com cães”. Foi construída uma tabela de frequências com as duas variáveis (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Tabela de frequências relativa às variáveis “ter cão” e “contacto com cães” de acordo com as respostas dos participantes do estudo

	Ter cão		Contacto com cães	
	Frequência (n)	Percentagem (%)	Frequência (n)	Percentagem (%)
Sim	75	59,52	36	75
Não	51	40,47	12	25
Total	127	100,0	48	100

Da observação da **Tabela 4**, verificou-se que a maioria da população do estudo (59,5%), já teve contacto com cães em geral, quer por ter ou já ter tido cão, ou ainda através do contacto com cães alheios, (n=36; 75%).

Quanto às viagens dos participantes, verificou-se que (88,2%) dos participantes já viajaram para fora de Portugal. De modo a perceber o risco de poder contrair BL durante as viagens realizadas por eles, foram associadas as variáveis, “Zona de risco” e “Zona endémica”, como apresentado na **Figura 14**.

Tendo em conta, os países por onde os participantes viajaram, os mesmos foram divididos em zonas de risco (países considerados de risco para adquirir a doença) e zona endémica (países considerados endémicos para BL). Pode observar-se na **Figura 14**, que 81/109 (74,3%), dos indivíduos inquiridos no referente estudo, já estiveram em zona de risco para BL e 29/76 (38,2%) já viajaram para zonas endémicas para BL.

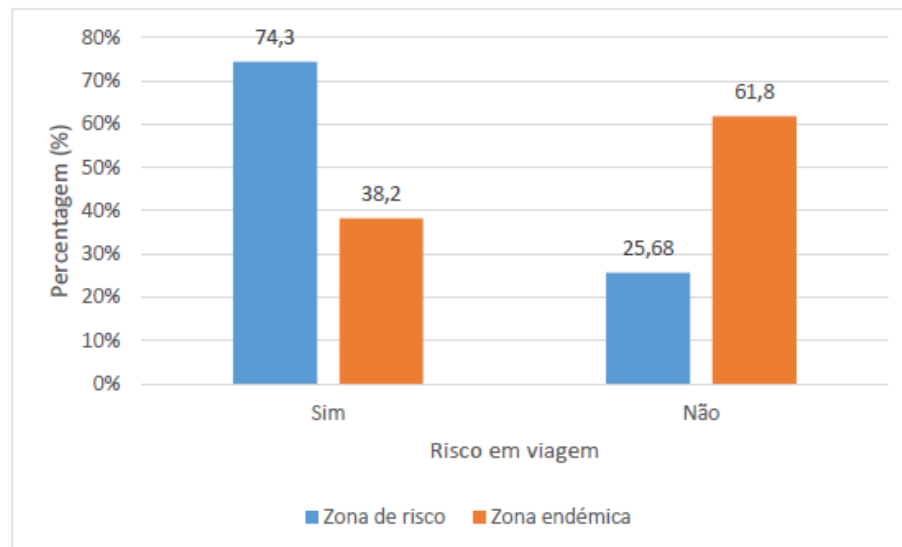


Figura 14 - Representação gráfica da distribuição do Risco de BL em viagem [Zona de risco (n=109) e Zona endémica (n=76)] em indivíduos do total de participantes no estudo (N=129).

Sabe-se que a exposição ocupacional, e/ou recreativa ou ainda residencial em campos e zonas florestadas, quando em áreas endémicas confere à população uma maior predisposição para desenvolver BL (Lindgren & Jaenson, 2006; EUCALB, 2009; Murray & Shapiro, 2010). Assim, na **Figura 15**, podem verificar-se, as atividades de lazer praticadas pelos participantes deste estudo. Estas foram categorizadas em: caça, agricultura, jardinagem, campismo, caminhadas em área de floresta, caminhadas em área arborizada e outras.

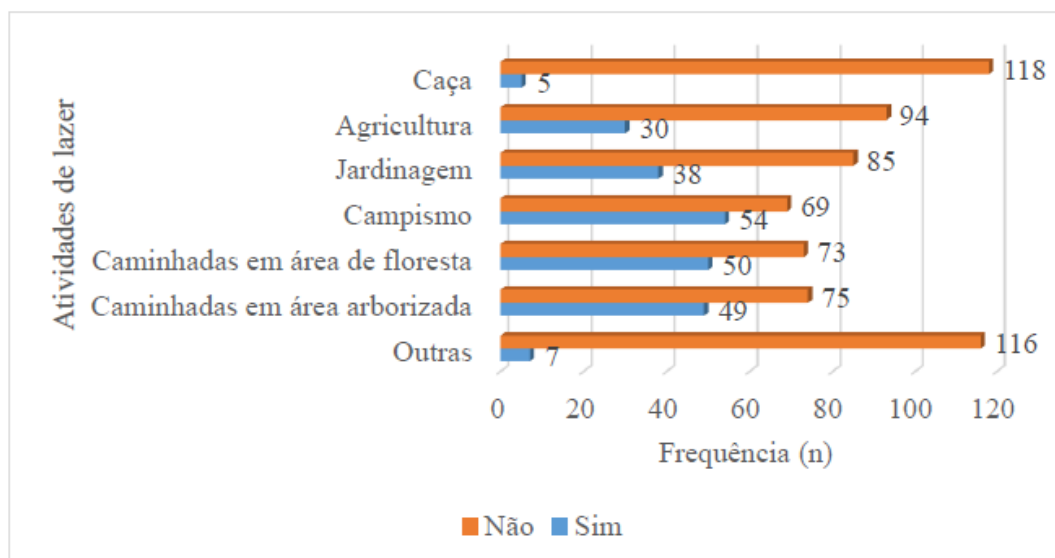


Figura 15 - Representação gráfica da distribuição das atividades de lazer praticadas por (n=124) indivíduos do total de participantes do estudo

Pode observar-se pelo gráfico da **Figura 15**, que a atividade mais realizada pelos participantes foi o campismo (n=54; 43,9%), e a menos realizada foi a caça, referida apenas por (n=5; 4,1%) dos mesmos. A categoria “Outras”, teve como respostas, piqueniques, banhos em piscinas naturais, praia, mergulho e *trail*, no entanto praia e mergulho não constituem um risco real de contrair a doença, objeto da presente investigação.

Relativamente à estadia em área florestada, esta foi realizada por 58/126 (48%) dos participantes.

Sintomas da Borreliose de Lyme

Tabela 5 - Distribuição dos sintomas major relacionados com BL descritos pelos participantes do estudo

	Pápula	Mancha avermelhada	Febre	Artrite	Miocardite	Pericardite	Paralisia
	n (%)						
Sim	6 (4,8)	3 (2,4)	16 (12,7)	28 (22,2)	0 (0)	1 (0,8)	2 (1,6)
Não	120 (95,2)	123 (97,6)	110 (87,3)	97 (77,8)	126 (100)	125 (99,2)	124 (98,4)

É possível verificar, pela distribuição dos sintomas relacionados com BL (**Tabela 5**), que estes não são muito frequentes na população em estudo, sendo, no entanto, a artrite o sintoma referido com mais frequência entre todos os outros (n=28; 22,2%).

Anticorpos anti-*B. burgdorferi* s.l.

Com as 129 amostras serológicas, foi realizado o teste de **IFA** como teste rastreio. É possível observar os resultados obtidos através da **Tabela 6**.

Tabela 6 - Tabela de frequências dos títulos obtidos pelo teste IFA na amostra populacional dos participantes do estudo

Diluição terminal	Frequência (n)	Percentagem (%)
<1/32	48	37,2
1/32	17	13,2
1/64	23	17,8
1/128	18	14
1/256	23	17,8
Total	129	100

A técnica de rastreio designada IFA revelou ser reativa em 31,8% (n=41) do total (N=129) dos soros analisados, correspondentes a igual número de participantes.

Como se observa na (**Tabela 6**), o teste de IFA foi categorizado nas diluições padronizadas: <1/32, 1/32, 1/64, 1/128 e 1/256, a última das quais é considerada o *cut-off*.

Em 37, 2% dos soros não se observou nenhuma fluorescência, já em 13,2% das amostras foi possível observar alguma reatividade na diluição 1/32, não tendo sido observado qualquer fluorescência nas diluições subsequentes. Em contrapartida revelaram positividade com valor diagnóstico as diluições 1/64, 1/128 e 1/256, 23 participantes (17,8%), 18 participantes (14%) e 23 participantes (17,8%) respetivamente.

Para confirmar a seropositividade [positiva e duvidosa (*borderline*)] para *B. burgdorferi* s.l., indicada pelo rastreio IFA nos soros dos participantes, foi realizado o teste de **WB - IgM** e **WB - IgG**. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Frequências dos resultados (Negativos, *Borderline* e Positivos) obtidos nos testes *Western Blot* - IgM e - IgG

	Western Blot IgM		Western Blot IgG	
	Frequência (n)	Percentagem (%)	Frequência (n)	Percentagem (%)
Negativo	37	90,2	36	87,8
<i>Borderline</i>	2	4,9	4	9,8
Positivo	2	4,9	1	2,4
Total	41	100	41	100

Dos 41 indivíduos selecionados para o teste de WB IgM obtiveram-se dois resultados *borderline* e dois positivos e para o teste WB IgG quatro soros com título *borderline* e um considerado positivo. Isto significa que ocorreu reação antigénio-anticorpo, o que é demonstrativo da presença de anticorpos anti- *B. burgdorferi* s.l IgM e IgG nas respetivas amostras séricas.

Relação entre as diversas características populacional da amostra e a presença de anticorpos anti- *B. burgdorferi* s.l para as imunoglobulinas IgM e IgG no teste de Western Blot

Foi analisada a relação dos resultados duvidosos e positivos obtidos nos soros dos participantes deste estudo com as diversas variáveis que caracterizaram a amostra populacional e ainda o significado dos resultados negativos.

Assim começando pelos **resultados negativos**, tanto para IgM (90,2%) como para IgG (87,8%), prevalece o facto de corresponderem, em grande parte ao género feminino (IgM 22-/41; IgG 23-/41), sendo a maioria da classe etária ≥ 75 anos (IgM 8-/41; IgG 16-/41) e dos 25-29 anos (IgM 5-/41; IgG 7-/41). Tal como na caracterização da população, a maioria dos resultados negativos, correspondem a participantes numa situação profissionalmente ativa (IgM 16-/41; IgG 17-/41) ou de reforma (IgM 16-/41; IgG 14-/41), que nasceram em Portugal (IgM 33-/41; IgG 32-/41) e não reportaram nenhuma profissão considerada de risco (IgM 35-/41; IgG 34-/41).

Analizando pormenorizadamente os fatores de risco para a BL, apesar de grande parte da população em estudo não ter tido nenhum tipo de contato com carraças, foi, no entanto, possível verificar que cinco (5) indivíduos do referido universo (n=41) com resultado negativo no teste WB (IgM/IgG) tiveram contacto com a carraça no seu corpo e dois (2) deles não sabem se existiu algum contacto, bem como quatro (4) no mesmo universo foram mordidos por carraça e igual número (n=4) reportaram não saberem se foram mordidos. Apesar do potencial risco, a partir da exposição a carraças, principalmente em caso de mordedura, situação que essa exposição parece ter sido inofensiva, visto que os resultados de IgM como de IgG foram negativos. Nos casos concretos de mordedura, a carraça pode não ter sido transmissora dos agentes causais da BL e caso os tenha transmitido pode não ter havido tempo para ocorrer infeção ou até a transmissão das borrelíias ter sido reduzida e o sistema imunológico dos indivíduos ter sido suficientemente competente para eliminar as borrelíias transmitidas. Também o facto destas mordeduras, segundo o relato dos participantes em causa, terem ocorrido em duas das situações há pelo menos dois anos e numa outra situação há 18 anos, sendo bastante improvável que tenha existido um resultado positivo ou mesmo *borderline* para WB-IgM, permanecendo a dúvida se o resultado de WB - IgG seria reativo ou não, visto que já se passaram muitos anos na maioria dos casos.

Relativamente à estadia em área florestada, esta foi uma variável frequente quando se cruzam os resultados quer para IgM quer para IgG (19/41). Em muitos casos, os indivíduos tiveram esse contacto na sua residência ou em casas de férias e também em zonas rurais.

Quanto às viagens, a maioria dos participantes com resultado negativo tanto para IgM (33/41) como para IgG (32/41), referiu já ter estado fora de Portugal. Estiveram em zonas consideradas de risco 23/41 (IgM) e 22/41 (IgG) dos inquiridos com resultado negativo e apenas 9/22 (IgM) e 7/22 (IgG) dos mesmos estiveram em zonas endémicas.

As atividades de lazer, por sua vez, podem ter um risco associado que leve a contrair a doença, muito pela exposição a espaços de ampla vegetação. No entanto, foi possível verificar, que dentro do nosso universo populacional estas atividades não foram muito praticadas. Na atividade “caça”, apenas dois (2) dos 41 indivíduos com resultado negativo no WB-IgM/-IgG praticaram esta atividade como lazer. Já na atividade ‘agricultura’ e dentro do mesmo universo de 41 indivíduos, esta foi reportada por nove (9) e oito (8) dos participantes, cujos soros foram negativos respetivamente para IgM e IgG, enquanto que a ‘jardinagem’ foi a atividade praticada por 12 e 11 dos indivíduos participantes, cujo resultado foi igualmente negativo no WB para -IgM e -IgG, respetivamente. Quando reportada a atividade ‘campismo’ foi revelada como tendo sido a mais praticada, sendo que 18 do total de (n=41) participantes, não revelaram a presença de anticorpos anti-*B. burgdorferi* s.l., quer para IgM quer para IgG. Relativamente às caminhadas, estas foram reportadas para as áreas florestadas por 13/41 indivíduos e 12/41 indivíduos, respetivamente para os resultados de IgM e de IgG. Quanto às áreas arborizadas, 16/41 participantes do estudo assim como 12 dos 41 indivíduos referiram afirmativamente essa presença.

Assim como nas atividades de lazer, também os sintomas associados a BL, são muito pouco frequentes na população participante deste estudo e por esse motivo a frequência dos negativos que tiveram sintomatologia foi baixa. Apenas 1/41 indivíduos teve pápula, sendo o resultado negativo tanto para IgM como para IgG. A febre e a artrite foram os sintomas mais frequentes, a febre foi relatada em 4/41 e 5/41 dos testes WB -IgM e -IgG, respetivamente, enquanto a artrite teve 7/41 IgM e 8/41 IgG dos indivíduos. Apenas um (1) dos 41 indivíduos cujo soro foi avaliado pelo teste de WB -IgM teve paralisia, tendo o resultado sido negativo. Já o sintoma mancha avermelhada foi apenas referida por um

participante, cujo resultado foi negativo no teste de *WB* tanto para IgM como IgG. Nenhum indivíduo deste estudo reportou ter tido sintomas de miocardite e de pericardite.

Dos 41 soros testados para *WB* -IgM e -IgG, fomos relacionar os resultados com os do teste rastreio (IFA). Para a diluição 1/128, foram negativos 16 soros para IgM e 17 para IgG, enquanto que para a diluição 1/256, correspondente ao *cut-off* os resultados obtidos foram 21 e 19 soros para IgM e IgG, respetivamente. Com estes resultados verifica-se que mesmo um teste IFA com resultado positivo não significa necessariamente que o teste confirmatório (*WB*) também seja positivo já que existem reações cruzadas com outros agentes infecciosos, que podem mostrar reatividade no teste de imunofluorescência cuja sensibilidade é, por isso, inferior à do teste de *Western Blot* razão pela qual o teste IFA, é apenas usado como teste de rastreio.

Relativamente aos **resultados positivos e *borderline***, apresentam-se as tabelas resumo para uma melhor visualização dos resultados e da relação destes com as diversas variáveis.

Tabela 8 – Perfil dos participantes com resultados positivo e *borderline* no teste de *Western Blot* relacionado com as principais variáveis

Participante	Indivíduo 1	Indivíduo 2	Indivíduo 3	Indivíduo 4	Indivíduo 5	Indivíduo 6	Indivíduo 7	Indivíduo 8	Indivíduo 9
Resultado <i>WB</i>	IgM +	IgM +	IgG +	IgM <i>borderline</i>	IgM <i>borderline</i>	IgG <i>borderline</i>	IgG <i>borderline</i>	IgG <i>borderline</i>	IgG <i>borderline</i>
Género	Masculino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Feminino	Masculino	Masculino	Masculino
Idade	57	26	37	27	77	84	65	28	66
Profissão de risco	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Estadia em área florestada	Sim	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
Atividades de lazer	Não	Campismo Outro: <i>trail</i>	Campismo Caminhadas em áreas florestadas e arborizadas	Campismo Caminhadas em áreas florestadas	Agricultura	Agricultura Jardinagem	Campismo Caminhadas em áreas florestadas	Agricultura Caminhadas em áreas arborizadas	Caminhadas em áreas arborizadas
Viagem a zona de risco	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim
Viagem a zona endémica	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim
Ter cão	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
Contacto com cães	-	Sim	-	Sim	-	-	Sim	-	-
Contato com carraça	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Sintomas	Febre	Não	Não	Não	Artrite	Não	Não	Não	Paralisia

Do total dos indivíduos cujos soros foram analisados laboratorialmente (N=129), obteve-se reatividade específica com valor diagnóstico em nove (9), isto é, foi detetada a presença de anticorpos anti - *B. burgdorferi* s.l. nas referidas amostras biológicas, com a seguinte distribuição: três (3) indivíduos com resultado positivo e seis (6) com resultado *borderline*. Neste grupo de nove indivíduos não se verificou predominância de género e a idade foi uma variável diversificada; cinco (5) deles reportaram encontrarem-se profissionalmente ativos e quatro (4) já estarem reformados. No que respeita à nacionalidade todos referiram ser portugueses. Também nenhum deles referiu ter uma profissão considerada de risco.

No mesmo grupo (n=9), verificou-se que não houve contacto com carraças, quer no corpo, quer pela presença de mordedura. Quatro (4) deles indicaram terem passado temporadas em área florestada e apenas dois (2) não viajaram para fora de Portugal. Sabe-se que no nosso país existem carraças da espécie *I. ricinus*, as quais são reconhecidas pela competência na transmissão de espiroquetas (borrélias) que causam a BL, pelo que se admite que estes indivíduos possam ter tido contacto em Portugal, com os referidos vetores/agentes patogénicos, apesar de não saberem ou não se recordarem (viés de memória). No entanto, a maioria (cinco) dos nove, estiveram em países considerados de risco (onde não foi incluído Portugal), sendo que quatro (4) deles, estiveram em zonas consideradas endémicas.

Quanto às atividades de lazer, verificou-se que as mesmas foram pouco praticadas, sendo, no entanto, o campismo a atividade mais referida (n=4) pelos participantes que responderam a esta questão.

Relativamente aos sintomas associados a BL, nenhum dos indivíduos apresentou ou teve: pápula, mancha avermelhada, miocardite ou pericardite. Apenas foram registados os sintomas febre, artrite e paralisia, mas em distintos indivíduos, sintomas estes que podem ter sido desenvolvidos por outro tipo de doença ou quadro clínico. Os restantes indivíduos foram assintomáticos, apesar dos resultados mostrarem evidência do contacto com as borrélias da espécie *B. burgdorferi* s.l., no entanto sem a presença de sintomatologia. Estes resultados vão ao encontro de uma das preocupações deste estudo, a presença de anticorpos anti-*B. burgdorferi* s.l., sem sintomatologia em indivíduos saudáveis ou que aparentam sê-lo e, como tal, reúnem os critérios para a dádiva de sangue.

Em 1989, Boden e colaboradores, observaram a presença de *B. burgdorferi* em componentes sanguíneos tais como, plasma, plaquetas e eritrócitos dos dadores de sangue. Apesar desta evidência, não foram reportados casos de transmissão da BL por transfusão sanguínea. Segundo as *Guidelines* da World Health Organization (WHO), caso o indivíduo apresente sintomas concordantes com BL, serão excluídos da doação sanguínea e por precaução, em caso de diagnóstico confirmado de BL, a doação deve ser adiada por 28 dias após o tratamento e total recuperação do indivíduo. Em Portugal também se considera que um candidato a dador de sangue pode ser aceite para a dádiva de sangue um mês após a resolução da infeção, contudo caso haja complicações crónicas, o indivíduo deverá ser suspenso definitivamente da dádiva de sangue (Matos, *et al.*, 2014). Tanto em Portugal, como em Inglaterra, não são feitos despistes para uma possível presença de anticorpos anti - *B. burgdorferi* s.l. nos dadores de sangue. (Linden & Bianco, 2001; UKBTS, 2005; Halperin, J.J., 2011; WHO, 2012; SNS, 2017).

Na **Tabela 8**, pode ser observado o perfil de cada indivíduo com resultado positivo e *borderline*, pelo teste *WB*, onde se constata que, apesar de não existir contacto com carraças nem qualquer dos participantes exercer qualquer profissão considerada de risco, todos tiveram algum tipo de exposição a fatores de risco, potenciando a possibilidade de contacto com o agente infeccioso. Os **dois resultados positivos para IgM**, revelaram que a exposição ou foi recente, pois o título de anticorpos IgM é o primeiro a elevar-se, ou então o mesmo será devido a uma nova exposição, correspondendo, nesse caso, a uma reinfeção. Também é possível que a infeção tenha ocorrido anteriormente, tendo ficado a(s) espiroqueta(s) latente(s), isto, como que “adormecidas” e apenas agora por alguma diminuição da ação do sistema imune, ter ocorrido reativação com a consequente deteção de anticorpos na avaliação serológica. Dos nove indivíduos com reatividade específica, apenas um deles mostrou anticorpos da classe IgG positivos, o que indica que o contacto com borrélias poderá ter ocorrido há anos, visto que é característico deste tipo de anticorpos permanecer na corrente sanguínea durante vários anos eventualmente até décadas.

Relativamente aos seis indivíduos com **resultados *borderline*** (dois para IgM e quatro para IgG), considera-se que não devem ser ignorados, já que estes resultados podem ter

importância clínica, devendo os mesmos ser acompanhados pelo médico assistente com base no seu historial clínico. O LBL do IHMT, recomenda nestes casos, uma nova colheita de sangue (geralmente dentro de aproximadamente seis meses), para uma melhor avaliação, visto que este resultado poderá indiciar a presença de borrélias, tendo por isso importância clínica, ou ainda, podendo tratar-se de uma reação cruzada por outro agente infeccioso, ou até traduzir alguma anomalia no contexto de autoimunidade que, por sua vez, deverá ser também clinicamente investigada e acompanhada.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A BL é uma doença emergente, que também atinge a população portuguesa e que deverá continuar a ser estudada para se conhecer a sua verdadeira amplitude no nosso país. Nos últimos anos, tem-se verificado um aumento significativo da distribuição geográfica dos casos de BL, pelo que se admite que a mobilidade populacional tenha impacte na Saúde Pública.

O diagnóstico da BL pode assim ser um desafio para os clínicos e para o laboratório, devido ao facto da respetiva sintomatologia ser muito semelhante, e até sobreponível a outras doenças mesmo podendo também cursar sem qualquer tipo de sintoma. O facto de alguns indivíduos poderem ser expostos às bactérias do complexo *B. burgdorferi* s.l., sem desenvolverem sintomas clínicos desperta um grande interesse do ponto de vista da investigação imunológica.

Como foi possível verificar neste trabalho, com uma amostra relativamente pequena, nove indivíduos aparentemente saudáveis, sem sintomatologia concordante com o diagnóstico de BL, tiveram resultados positivos e *borderline* através do teste confirmatório (WB), revelando assim contacto prévio com o agente infeccioso em alguma fase da sua vida, apesar de não ter sido referido qualquer contacto direto ou indireto com os vetores (carraças). Esta evidência permitiu concluir que existiram outros fatores de risco associados a estes indivíduos.

Estes resultados levantam uma preocupação relacionada com a hemotransfusão, visto que seis dos nove indivíduos cumprem os critérios de idade para a doação de sangue. Estudos já realizados evidenciam a presença dos anticorpos anti- *B. burgdorferi* s.l. nos componentes sanguíneos a diferentes temperaturas, no entanto ainda não existe evidência de transmissão por doação de sangue, sendo que também esta problemática não é muito estudada.

No futuro, seria um importante foco para novos trabalhos de investigação, que deverão envolver um maior número de participantes de modo a estudar-se a população assintomática portuguesa no âmbito da BL, podendo com isso ser estudada a população de dadores de sangue.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguero-Rosenfeld, M.E., Wang, G., Schwartz, Ira, Wormser, G.P. (2005). Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clin Microbiol Rev.*, 484-509.

Azevedo, N.M.D. (2015). Lyme neuroborreliosis: a literature review. Mestrado Integrado em Medicina – Doenças Infeciosas. Faculdade de Medicina Universidade do Porto. 35pp.

Bakker, R. G., Li, C., Miller, M. R., Cunningham, C., & Charon, N. W. (2007). Identification of specific chemoattractants and genetic complementation of a *Borrelia burgdorferi* chemotaxis mutant: flow cytometry-based capillary tube chemotaxis assay. *Appl Environ Microbiol*, 1180-1188.

Banerjee, S., Smith, J., & Fernando, K. (1994). Lyme disease in British Columbia-An update. *British Columbia Med*, 540-541.

Barbour, A. (1984). Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med.*, 521-525.

Barbour, A. G., & Hayes, S. F. (1986). Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev*, 381-400.

Belisle, J., Brandt, M., Radolf, J., & Norgard, M. (1994). Fatty acids of *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. *J Bacteriol*, 2151-2157

Berger, S. (2017). *Infectious Disease of Portugal*. 2017 edition, GIDEON Informatics, Los Angeles.

Berglund, J., Eitrem, R., Ornstein, K., Lindberg, A., Ringnér, Å., Elmrud, H., Carlsson, M., Runehagen, A., Svanborg, C., Norrby, R. (1995). An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden. *New Eng J Med*, 333(20), 1319–1324.

Bhate, C., & Schwartz, R. A. (2011a). Lyme disease: Part I. Advances and perspectives. *J Am Acad o Dermatol*, 64(4), 619–636. doi.org/10.1016/j.jaad.2010.03.046

Bhate, C., & Schwartz, R. A. (2011b). Lyme disease: Part II. Management and prevention. *J Am Acad Dermatol*, 64(4), 639–653. doi.org/10.1016/j.jaad.2010.03.047

Borchers, A. T., Keen, C. L., Huntley, A. C., & Gershwin, M. E. (2015). Lyme disease: A rigorous review of diagnostic criteria and treatment. *J Autoimmunity*, 57, 82– 115. doi.org/10.1016/j.jaut.2014.09.004

Bremell, D., & Dotevall, L. (2014). Oral doxycycline for Lyme neuroborreliosis with symptoms of encephalitis, myelitis, vasculitis or intracranial hypertension. *Eur J Neurol*, (21): pp. 1162-1167.

Burgdorfer, W., Barbour, A., Hayes, S., Benach, J., Grunwaldt, E., & Davis, J. (1982). Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science*, 1317-1319.

Busson, L., Reynders, M., Van den Wijngaert, S., Dahma, H., Decolvenaer, M., Vasseur, L., & Vandenberg, O. (2012). Evaluation of commercial screening tests and blot assays for the diagnosis of Lyme borreliosis. *Diag Microbiol and Inf Dis*, 73(3), 246– 251. doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.001

Caeiro, V. (1999). General review of tick species present in Portugal. *Parassitol*, 11-15.

Canica, M., Nato, F., du Merle, L., Mazie, J., Baranton, G., & Postic, D. (1993). Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp nov associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis*, 441-448.

Carvalho, L., & Nuncio, M. S. (2006). Laboratory diagnosis of Lyme Borreliosis at the Portuguese Nacional Institute of Health (1990-2004). *Euro Surveill*, 257-260.

Casjens, S., Palmer, N., van Vugt, R., Huang, W., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J., Dodson, R.J., Haft, D., Hickey, E., Gwinn, M., White, O., Fraser, C. (2000). A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia*

burgdorferi. *Mol Microbiol*, 490-516.

CDC (2015). Disponível em:

<https://www.cdc.gov/lyme/diagnostesting/labtest/twostep/index.html>. Acedido em: 10/02/2016

CDC (2015). Disponível em: <http://www.cdc.gov/lyme/stats/humancases.html>, Acedido em: 10/02/2016

Cerar T, Ruzić-Sabljić E, Glinsek U, Zore A, Strle F (2008) Comparison of PCR methods and culture for the detection of *Borrelia* spp. in patients with erythema migrans. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jul;14(7):653-8. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02013.x.

Charon, N., & Goldstein, S. (2002). Genetics of motility and chemotaxis o a fascinating group of bacteria: the spirochetes. *Annu Rev Genet.*, 47-73.

Collares-Pereira, M., & Franca, I. (2000). Borreliose de Lyme: ocorrência em Portugal. *Trab Soc Port Dermatol e Venereol*, 107-117.

Collares-Pereira, M., Couceiro, S., Franca, I., Kurtenbach, K., Schafer, S. M., Vitorino, L., Gonçalves, L., Baptista, S., Vieira, ML., Cunha, C. (2004). First Isolation of *Borrelia lusitaniae* from Human Patient. *J Clin Microbiol*, 1316-1318.

De Silva, A., & Fikrig, E. (1995). Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ticks* during blood feeding. *Am J Trop Med Hyg*, 397-404.

ECDC (2014). Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/world-health-day-2014/documents/factsheet-lyme-borreliosis.pdf>. Acedido em: 12/03/2016

ECDC (2017). Disponível em: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/ixodes-ricinus-current-known-distribution-europe-april-2017>. Acedido em: 20/05/2017

EUCALB (2009). Disponível em: European Concerted Action on Lyme Borreliosis: <http://www.eucalb.com>. Acedido em: 07/03/2017

Estrada-Peña, A., Venzal, J. M., Nava, S., Mangold, A., Guglielmone, A. A.,

Labruna, M. B., Fuente, J. (2012). Reinstatement of *Rhipicephalus (Boophilus) australis* (Acari: Ixodidae) with redescription of the adult and larval stages. *J. Med. Entomol.* 49, 794–802. doi: 10.1603/ ME11223

Franke, J., Hildebrandt, A., & Dorn, W. (2013). Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes--updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks Tick Borne Dis.*, 11-25.

Fraser C., Casjens, S., Huang, W., Sutton, G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K., Dodson, R., Hickey, E., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J., Fleischmann, R., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Wathney, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fuji, C., Cotton, M.D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H.O., Venter J.C. (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature.*, 390:580–586.

Ge, Y., Li, C., Corum, L., Slaughter, C., & Charon, N. (1998). Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol*, 2418-2425.

Gerstenblith, T. A., & Stern, T. A. (2014). Lyme Disease: A Review of Its Epidemiology, Evaluation, and Treatment. *Psychosomatics*, 55(5), 421–429. doi.org/10.1016/j.psym.2014.02.006

Gill S.J., and Johnson R.C. 1992. Immunologic Methods for the Diagnosis of Infections by *Borrelia burgdorferi* (Lyme Disease). In Rose R.N., De Macario E.C., Fahey J.L., Friedman H., Penn G.M. (eds), Manual of Clinical Laboratory Immunology, Fourth ed, Washington, D.C., pp 452-458.

Gillet, L., Schroeder, H., Mast, J., Thirion, M., Renauld, J., Dewals, B., & Vanderplasschen, A. (2009). Anchoring tick salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II to membrane increases their immunogenicity. *Vet Res*, 51.

Glockner, G. S.-S., Schilhabel, M., Felder, M., Suehnel, J., Wilske, B., & Platzner, M. (2006). Comparative genome analysis: selection pressure on the *Borrelia* vls cassettes is essential for infectivity. *BMC Genomics*, 6038-6044.

- Golde, W. T., Robinson-Dunn, B., Stobierski, M. G., Dykhuizen, D., Wang, I. N., Carlson, V., Campbell, G. L.** (1998). Culture-confirmed reinfection of a person with different strains of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *J Clin Microbiol*, 36(4), 1015–1019.
- Guo, B., Brown, E., Dorward, D., Rosenberg, L., & Höök, M.** (1998). Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol.*, 711-723.
- Halperin, J.J.** (2011). Lyme Disease – An evidence-based Approach. CABI, UK. (p.108)
- Hanincová K., T. V., Koci, J., Schäfer, S., Hails, R., Ullmann, A., Piesman, J., Kurtenbach, K.** (2003). Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. *Appl Environ Microbiol*, 2825-2830.
- Henningsson, A. J.** (2011). Clinical, Epidemiological and Immunological Aspects of Lyme Borreliosis. doi.org/ISBN 978-91-7393-097-0
- Hubalek, Z., & Halouzka, J.** (1997). Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur J Epidemiol.*, 951-957.
- Hytönen, J., Hartiala, P., Oksi, J., & Viljanen, M.** (2008). Hytönen J, Hartiala P, Oksi J, Viljanen MK. Borreliosis: recent research, diagnosis, and management. *Scand J Rheumatol*, 161-172.
- Ivanova, L.B., Tomova, A., Gonzalez-Acuna, D., Murua, R., Moreno, C. X., Hernandez, C., Cabello, J., Daniels, T.J., Godfrey, H.P., Cabello, F.C.** (2013). *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. *Environ Microbiol*, 1069-1080.
- Junior, I. M., Zahdi, M. R., Filho, A. B., & Cruz, C. R.** (2007). Doença de Lyme: diagnóstico e tratamento Lyme Disease: diagnosis and treatment. *Rev Bras Med Fam e Com*, 3, 76–81.
- Kamradt, T.** (2002). Lyme disease and current aspects of immunization. *Arthritis Research*, 4(1), 20–29. Disponível em:

<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L34100486%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1186/ar379%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=14659905&id=doi:10.1186%2Far379&atitle=Lyme+disease+and+current+aspects+of+immunizati>. Acedido em: 03/03/2017

Karami, A. (2012). Molecular Biology of *Borrelia burgdorferi*. In Karami A (ed) *Lyme Disease InTech*, 1-26.

Kurtenbach, K., De Michelis, S., Sewell, H.S., Etti, S., Schäfer, S.M., Holmes, E., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Hanincová, K, Labuda, M., Bormane, A., Donaghy, M. (2002). The key roles of selection and migration in the ecology of Lyme borreliosis. *Int J Med Microbiol*, 152-154.

Linden, J., Bianco, C. (2001). *Blood Safety and Surveillance*. Marcel Dekker Inc., New York. (pp. 403-406)

Lindgren, E., & Jaenson, T. G. (2006). Lyme Borreliosis: influences of climate and climate changes, epidemiology, ecology and adaptation measures. *WHO, Regional Office for Europe*.

Matos, A., Sousa, AP., Araújo, F., Maia, F., Esteves, J., Pinheira, MA., Dobao, ML., Teodósio, R. (2014). Manual de Triagem de Dadores de Sangue. Ed Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST, IP). 1º Ed, pág. 101.

Margos, G., Vollmer, S. A., Ogden, N. H., & Fish, D. (2011). Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect Genet Evol.*, 1545-1560.

Marques, A. R. (2015). Laboratory Diagnosis of Lyme Disease: Advances and Challenges. *Infect Dis Clin of North America*, 29(2), 295–307. doi.org/10.1016/j.idc.2015.02.005

Meléndez, M. E., Taylor, C. S., & Alanís, J. C. (2014). Enfermedad de Lyme: actualizaciones. *Gaceta Médica de México*, 84-95.

Mikkila, H., Seppala, I. J., Viljanen, M. K., Peltomaa, M. P., & Karma, A. (2000). The expanding clinical spectrum of ocular lyme borreliosis. *Ophtalmol*, 107, 581-587.

Monroe, J. (2001). Chapter 3 - Chapter Overview. Em J. Monroe, *Lyme Disease - Perspectives on Disease and Illness* (p. 22). Minnesota: CapstonePress. Edition of Murray, T. S., & Shapiro, E. D. (2010). Lyme Disease. *Clin Lab Med*, 311-328.

Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. (2014). *Microbiologia Médica*, 6ª Edição, Rio de Janeiro, Elsevier.

Núncio, M. S., & Carvalho, I. L. (2014). Borreliose de Lyme. Em *Doenças associadas a artropodes vetores e roedores* (pp. 87-99). Lisboa.

O'Connell, S. (2009). Lyme borreliosis. *Medicine*, 37(12), 644-648. doi.org/10.1016/j.mpmed.2009.09.010

Ogden, N., Trudel, L., Artsob, H., Barker, I., Beauchamp, G., Charron, D., Lindsay, L. (2006). Ixodes scapularis ticks collected by passive surveillance in Canada: analysis of geographic distribution and infection with Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi*. *J Med Entomol.*, 600-609.

Oksi, J., Nikoskelainen, J., Hiekkänen, H., Lauhio, A., Peltomaa, M., Pitkäranta, A., Viljanen, M. (2007). Duration of antibiotic treatment in disseminated Lyme borreliosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter clinical study. *Eur J Clin Microbiol & Infect Dis*, (26)8: 571-581.

Ornstein, K., Berglund, J., Nilsson, I., Norrby, R., & Bergström, S. (2001). Characterization of Lyme borreliosis isolates from patients with erythema migrans and neuroborreliosis in Southern Sweden. *J Clin Microbiol*, 39(4), 1294-1298. doi.org/10.1128/JCM.39.4.1294-1298.2001.

Parola, P., & Raoult, D. (2001). Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clin Microbiol Infect.*, 80-83.

Piesman, J., & Gern, L. (2004). Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitol*, 129-220

Piesman, J., Mather, T. N., Sinsky, R. J., & Spielman, A. (1987). Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J Clin Microbiol*, 557-558.

Piesman, J., Oliver, J., & Sinsky, R. (1990). Growth kinetics of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) in vector ticks (*Ixodes dammini*). *Am J Trop Med Hyg.*, 352-357.

Pollack, R. J., Telford, S. R., & Spielman, A. (1993). Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol.*, 1251-1255.

Preac-Mursic, V., Wilske, B., & Schierz, G. (1986). European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg*, 112-118.

Pritt, B., Mead, P., Johnson, D., Neitzel, D., Respicio-Kingry, L., Davis, J., Xia, L. (2016). Identification of a novel pathogenic Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*, 556-564.

Radolf, J. D., Caimano, M. J., Stevenson, B., & Hu, L. T. (2012). Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol*, 87-99.

Rijpkema, S. G. T., Tazelear, D. J., Molkeboer, H. J., Noordhoek, G. T., Plantinga, G., Schouls, L. M., Schellekens, J. F. P. (1997). Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin Microbiol and Infect*, 3(1), 109–116. doi.org/10.1111/j.1469- 0691.1997.tb00259.x.

Rizzoli, A., Hauffe, H. C., Carpi, G., Vourc'h, G. I., Neteler, M., & Rosà, R. (2011). Lyme borreliosis in Europe. *Eurosurveillance*, 16(27), 1–8. doi.org/19906 [pii]

Rosa, P. (1997). Microbiology of *Borrelia burgdorferi*. *Semin Neurol*, 5-10.

Rosa, P., Tilly, K. and P. Stewart. (2005). The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nature reviews Microbiol*, 3:129–43.

Sal, M. L. (2008). *Borrelia burgdorferi* uniquely regulates its motility genes and has an intricate flagellar hook basal body structure. *J Bacteriol*, 191:1912–1921.

Santos, M., Júnior, V. H., Ribeiro-Rodrigues, R., & Talhari, S. (2010). Borreliose de Lyme. *An Bras Dermatol*, 930–938.

Schnarr, S., Franz, J. K., Krause, A., & Zeidler, H. (2006). Lyme borreliosis. *Best Pract & Res Clin Rheumatol*, 20(6), 1099–1118. doi.org/10.1016/j.berh.2006.08.006

Schroeder, H., Daix, V., Gillet, L., Renaud, J., & Vanderplasschen, A. (2007). The paralogous salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II encoded by *Ixodes ricinus* ticks have broad and complementary inhibitory activities against the complement of different host species. *Microbes Infect*, 247–250.

Serviço Nacional de Saúde (SNS). (2017). Informação ao Dador de Sangue, Hospital Fernando Fonseca. Disponível em:
<https://www.sns.gov.pt/wp-content/uploads/2017/04/Mod.1-Dador-Sangue.pdf>. Acedido em: 25/06/2017

Shapiro, Eugene. (2014) Lyme disease. *Pediatr Rev.*, 500–509.

Shi, W., Yang, Z., Geng, Y., Wolinsky, L. E., & Lovett, M. A. (1998). Chemotaxis in *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol.*, 231–235.

Singh, S. K., & Girschick, H. J. (2004). Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *The Lancet Infect Dis*, 575–583.

Skogman, B. H., Hellberg, S., Ekerfelt, C., Jenmalm, M. C., Forsberg, P., Ludvigsson, J., Ernerudh, J. (2012). Adaptive and innate immune responsiveness to borrelia burgdorferi sensu lato in exposed asymptomatic children and children with previous clinical lyme borreliosis. *Clin and Develop Immunol*, 2012(II). doi.org/10.1155/2012/294587

- Smith, B. G., Jr, A. I., Milewski, M. D., & Shapiro, E. D.** (2011). Lyme Disease and Orthopaedic Implications of Lyme Arthritis. *J Am Acad Orthop Surg*, 91-100.
- Sonenshine, D., & Roe, R.** (2014). *Biology of ticks*. New York: Oxford University Press.
- Stanek, G., & Reiter, M.** (2011). *Clin Microbiol Infect.*, 487-93.
- Stanek, G., & Strle, F.** (2003). Lyme Borreliosis. *Lancet*, 1639-1647.
- Stanek, G., Fingerle, V., Hunfeld, K. P., Jaulhac, B., Kaiser, R., Krause, A., Kristoferitsch, W., O'Connell, S., Ornstein, K., Strle, F., Gray, J.** (2011). Lyme Borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 69-79.
- Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J., & Strle, F.** (2012). Lyme borreliosis. *The Lancet*, 379(9814), 461–473. doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60103-7
- Sternbach, G., & Dibble, C. L.** (1996). Willy Burgdorfer: Lyme Disease. *The J Emerg Med*, 631-634.
- Strle, F., & Stanek, G.** (2009). Clinical Manifestations and Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Curr Probl Dermatol*, (37) pp.51-110.
- Sykes, R.** (2014) An Estimate of Lyme Borreliosis Incidence in Western Europe, *Res Medica*, 22(1): pp. 76-87. doi:10.2218/resmedica.v22i1.743
- Rohani M.Y., Kamalanathan M., Tay S.T.** *Borrelia burgdorferi* (strain *B. afzelii*) antibodies among Malaysian blood donors and patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.*, 33(4):787-93
- Tay S.T., Kamalanathan M, Rohani M.Y.** (2002) *Borrelia burgdorferi* (strain *B. afzelii*) antibodies among Malaysian blood donors and patients. *Southeast Asian J Trop Med*

Public Health. 2002 Dec;33(4):787-93.

Takayama, K., Rothenberg, R., & Barbour, A. (1987). Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*, 2311-2313.

The New York Times (NYTIMES) (2014). Disponível em <https://www.nytimes.com/2014/11/20/health/willy-burgdorfer-who-found-bacteria-that-cause-lyme-disease-is-dead-at-89.html>. Acedido em: 20/06/2017

Tijssse-Klasen, E., Pandak, N., Hengeveld, P., Takumi, K., Koopmans, M. P., & Sprong, H. (2013). Ability to cause erythema migrans differs between *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. *Parasites & Vectors*, 6(1), 23. doi.org/10.1186/1756-3305-6-23

Tilly, K., Rosa, P., & Stewart, P. (2008). Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Dis Clin North Am*, 217-234.

The Center for Food Security and Public Health (CFSPH) (2011). Lyme Disease. Disponível em: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/lyme_disease.pdf. Acedido em: 10/06/2017

Tjernberg, I. (2011). Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis: anti-borrelia antibodies and the chemokine CXCL13. Disponível em: <http://www.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2:398541>, Acedido em: 10/04/2017.

Tsao, J. (2009). Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. *Vet Res*. Mar-Apr; 40(2): 36. doi: 10.1051/vetres/2009019.

United Kingdom Blood Transfusion Services (UKBTS) (2005). Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom. 7th Edition. Disponível em: <https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/...data/.../0117033715.pdf>,

Acedido em: 20/06/2017

Valenzuela, J., Charlab, R., Mather, T., & Ribeiro, J. (2000). Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem*, 18717-18723.

Wang, G., & Schwartz, I. (2011). Genus II - Borrelia. Em N. R. Krieg, J. T. Staley, D. R. Brown, B. P. Hedlund, B. J. Paster, N. L. Ward, . . . W. B. Whitman, *Bergey's Manual of Systematic: The Bacteroides, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*. (pp. 484-498). Springer.

Wang, G., Dam, A., Schwartz, I., & Dankert, J. (1999). Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensus Lato: Taxonomic, Epidemiological and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev*, 633-653.

Wilske, B. (2005). Wilske B. Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. *Ann of Med*, 568-579.

Wolgemuth, C.W., Charon, N., Goldstein, S., & Goldstein, R. (2006). The Flagellar Cytoskeleton of the Spirochetes. *J Mol Microbio Biotechnol*, 221-227.

World Health Organization (WHO) (2012). Guidelines on Assessing Donor Suitability for Blood Donation. Disponível em:

www.who.int/bloodsafety/.../bts_guideline_donor_suitability/en/. Acedido em: 07/06/2017

Wormser, G. P., Dattwyler, R. J., Shapiro, E. D., Halperin, J. J., Steere, A. C., Klempner, M. S., Nadelman, R. B. (2006). The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 1089-1134.

Xu, Q., McShan, K., & Liang, F. T. (2008). Modification of *Borrelia burgdorferi* to

overproduce OspA or VlsE alters its infectious behaviour. *Microbiol*, 3420–3429.

Xu, Y., Kodner, C., Coleman, L., & Johnson, R. (1996). Correlation of plasmids with infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto type strain B31. *Infect. Immun.*, 3870-3876.

Yannielli, L. (2004). 7. The tests and Treatments for Lyme Disease. *In*: L. Yannielli, *Deadly Diseases and Epidemics: Lyme Disease* (p. 62). New York: Infobase Publishing.

Zhang, J.-R., Hardham, J., Barbour, A., & Norris, S. (1997). Antigenic variation in Lyme disease *Borreliae* by promiscuous recombinant of VMP-like sequence cassettes. *Cell*

ANEXOS

6. ANEXOS

ANEXO I

CONSENTIMENTO INFORMADO

Título do Estudo: Infecção por *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Estudo em indivíduos assintomáticos

Promotor: Instituto de Higiene e Medicina Tropical / Universidade Nova de Lisboa – Unidade de Ensino e Investigação (UEI) de Clínica das Doenças Tropicais e UEI de Microbiologia Médica

Investigadores: Salima Jamal (Mestranda), Maria Luísa Vieira (PhD) e Rosa Teodósio (PhD)

Contactos e-mail investigadores:

salima.a.j@gmail.com; vieira@ihmt.unl.pt; RosaTeo@ihmt.unl.pt

Contacto: Rua da Junqueira, nº.100, 1349-008 Lisboa

Telefone: 21 365 26 61

Fax: 21 363 21 05

INTRODUÇÃO

A borreliose de Lyme é uma doença com importância epidemiológica, clínica e social. É transmitida aos seres humanos através da mordedura de carraças infetadas por bactérias chamadas borrélias. No Homem, pode afetar diversos órgãos e sistemas tais como a pele, sistema nervoso, articulações e o coração. Atualmente, está documentado que a Borreliose de Lyme representa um encargo considerável para a saúde pública na Europa, afetando todos os anos milhares de pessoas. Portugal é um dos países onde é obrigatória a declaração desta doença. Apresenta-se em seguida toda a informação sobre o estudo, para poder decidir se quer ou não participar. Esta é uma decisão pessoal. Se tiver alguma questão ao ler este documento, pode colocá-la a quem lho forneceu, e contactar qualquer um dos investigadores.

A) OBJECTIVO DO ESTUDO

Esta doença pode ser confundida com outras doenças, devido à semelhança das manifestações clínicas, ou mesmo à ausência de sintomas. Os estudos publicados sobre esta doença em Portugal são ainda poucos. Pretendemos saber se as pessoas possuem anticorpos específicos contra *Borrelia burgdorferi* s.l.

B) PROCEDIMENTO DO ESTUDO

Se aceitar fazer parte deste estudo terá apenas que preencher o questionário que se segue. Para saber se já foi infetado(a) vamos precisar de uma pequena parte do sangue que lhe for colhido quando fizer análises para a deteção de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* s.l.. Mais tarde a amostra será encaminhada para o Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme da UEI de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), onde será feita a análise. Se der a sua autorização, será contactado se o resultado for positivo, para que possa ser encaminhado para o seu médico assistente. O seu médico se assim entender poderá ter o auxílio da Dra Rosa Teodósio, médica do IHMT.

C) PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA E LIBERDADE PARA DESISTIR

É totalmente sua a decisão de participar ou não. Se não quiser participar não haverá prejuízo para si.

ANEXO I

D) RISCOS E DESCONFORTOS

Para participar neste estudo, o risco e desconforto que existe é mínimo, ligado apenas à colheita de sangue.

E) BENEFÍCIOS

Para si haverá benefício caso tenha anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* s.l. (esteja infetado) pois será avisado e poderá ser tratado pelo médico assistente.

Para a população, o benefício que há neste estudo é permitir que se conheça a distribuição da doença, em indivíduos assintomáticos residentes em Portugal e alertar as autoridades de saúde.

F) COMPENSAÇÃO

Não terá que pagar nada para fazer parte deste estudo, nem será pago para tal.

G) CONFIDENCIALIDADE

As suas informações são confidenciais.

Os questionários vão ter um código e não o seu nome. Apenas o investigador terá acesso aos nomes correspondentes aos códigos, que serão guardados por ele. Toda a informação relativa às amostras e aos dados será guardada por um prazo máximo de 5 anos e após este período serão destruídos.

H) PUBLICAÇÃO DE RESULTADOS

Os resultados deste estudo serão comunicados às autoridades de saúde, mostrados em reuniões científicas e publicados em revistas científicas, mas não terão dados confidenciais.

I) DECLARAÇÃO DA PARTICIPANTE

Fui convidado a participar no estudo sobre Doença de Lyme, e sei que envolve a utilização de uma amostra de sangue obtida na colheita que realizo neste serviço. Fui informado de que os riscos são mínimos, e sei que os benefícios diretos só existem se estiver infetado. Foi-me dado o nome do investigador com quem posso contactar. Li toda a informação deste documento, ou foi-me lida. Tive oportunidade de fazer perguntas sobre o estudo. Autorizo voluntariamente a minha participação neste estudo, e sei que tenho liberdade para desistir a qualquer altura, sem prejuízo para os meus cuidados de saúde neste Instituto.

Nome do participante:

Contato telefónico: _____

Código: _____

Data: __/__/____

Assinatura do participante (cruz se iletrado)

Testemunha (caso o participante seja iletrado):

ANEXO II



Estudo sobre

"Infecção por *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Estudo em indivíduos assintomáticos"

Parte I

Código _____

1. Idade (anos) ____

2. Teve ou tem alguma das seguintes doenças:

2.1. **Mononucleose infecciosa** (também conhecida por **doença do beijo**, é uma infeção viral caracterizada por febre, aumento de tamanho dos gânglios linfáticos, aumento do baço, manchas na pele e dor de garganta, tendo resolução em 10-15 dias)

☐ Sim ☐ Não ☐ Não sei

2.2. Se sim há quanto tempo _____

2.3. Qual foi a medicação _____

2.4. **Artrite Reumatóide** (doença inflamatória crónica, causa dores e deformação nas articulações, principalmente das mãos e pés)

☐ Sim ☐ Não ☐ Não sei

2.5. Se sim há quanto tempo _____

2.6. Qual foi a medicação _____

2.7. **Espondilartrite ou espondilite anquilosante** (inflamação da coluna vertebral, dolorosa, com ossificação dos ligamentos)

☐ Sim ☐ Não ☐ Não sei

2.8. Se sim há quanto tempo _____

2.9. Qual foi a medicação _____

ANEXO II

2.10. **Febre Reumática** (doença caracterizada por inflamação das articulações, febre, inflamação do coração, alterações do sistema nervoso, manchas na pele)

☐ Sim ☐ Não ☐ Não sei

2.11. Se sim há quanto tempo_____

2.12. Qual foi a medicação_____

2.13. **Sífilis** (manifesta-se por uma úlcera na zona genital, na fase inicial, depois aparecem lesões secundárias como rash cutâneo)

☐ Sim ☐ Não ☐ Não sei

2.14. Se sim há quanto tempo_____

2.15. Qual foi a medicação_____

Se respondeu **Sim** a alguma das questões anteriores, infelizmente não poderá participar no estudo, pois estas doenças podem causar um resultado falso positivo para a Borreliose de Lyme. Obrigado pela colaboração.

ANEXO III



Estudo sobre

"Infecção por *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Estudo em indivíduos assintomáticos"

Parte II

Código _____

1. Data de Nascimento __/__/____

2. Idade (anos) ____

3. Género:

☐ Masculino ☐ Feminino

4. Naturalidade _____

5. Profissão _____

6. Alguma vez teve uma das seguintes profissões:

☐ Agricultor ☐ Jardineiro ☐ Caçador

7. Alguma vez viu uma carraça em alguma zona do seu corpo?

☐ Sim ☐ Não ☐ Não sei/ Não me lembro

8. Alguma vez foi mordido por uma carraça?

☐ Sim ☐ Não ☐ Não sei/Não me lembro

ANEXO III

8.1. Se sim, há quanto tempo? _____

9. Vive, viveu ou passou temporadas em área de floresta ou arbustos?

☐ Sim ☐ Não

9.1. Há quanto tempo? _____

10. Tem ou teve cães?

☐ Sim ☐ Não

11. Se não, já teve contacto (cuidar/brincar) com cães?

☐ Sim ☐ Não

12. Já esteve fora de Portugal?

☐ Sim ☐ Não

12.1 Se sim, para que países _____

12.2. Se sim, há quanto tempo _____

ANEXO III

13. Em que zona(s) de Portugal já esteve durante a sua vida?

Portugal Continental:

- | | | | | |
|---|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> Viana do Castelo | <input type="checkbox"/> Braga | <input type="checkbox"/> Vila Real | <input type="checkbox"/> Bragança | <input type="checkbox"/> Porto |
| <input type="checkbox"/> Aveiro | <input type="checkbox"/> Viseu | <input type="checkbox"/> Guarda | <input type="checkbox"/> Coimbra | <input type="checkbox"/> Castelo Branco |
| <input type="checkbox"/> Leiria | <input type="checkbox"/> Santarém | <input type="checkbox"/> Portalegre | <input type="checkbox"/> Lisboa | <input type="checkbox"/> Setúbal |
| <input type="checkbox"/> Évora | <input type="checkbox"/> Beja | <input type="checkbox"/> Faro | | |

Açores:

- | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Corvo | <input type="checkbox"/> Flores | <input type="checkbox"/> Faial | <input type="checkbox"/> Pico | <input type="checkbox"/> São Jorge |
| <input type="checkbox"/> Graciosa | <input type="checkbox"/> Terceira | <input type="checkbox"/> São Miguel | <input type="checkbox"/> Formigas | <input type="checkbox"/> Santa Maria |

Madeira:

- | | | | |
|----------------------------------|--------------------------------------|---|--|
| <input type="checkbox"/> Madeira | <input type="checkbox"/> Porto Santo | <input type="checkbox"/> Ilhas Desertas | <input type="checkbox"/> Ilhas Selvagens |
|----------------------------------|--------------------------------------|---|--|

14. Pratica ou praticou alguma destas atividades por lazer:

- | | | | |
|--|--|---|-----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Caça | <input type="checkbox"/> Agricultura | <input type="checkbox"/> Jardinagem | <input type="checkbox"/> Campismo |
| <input type="checkbox"/> Caminhadas em áreas florestadas | <input type="checkbox"/> Caminhadas em áreas arborizadas | <input type="checkbox"/> Outros contatos com a Natureza | |

Quais _____

ANEXO III

15. Tem ou teve algum dos seguintes sintomas, nos últimos dois anos:

- ☐ Pápula [elevação pequena da pele (menos de 1cm) rosada ou avermelhada]
- ☐ Mancha avermelhada na pele em forma oval
- ☐ Febre (superior a 39°C)
- ☐ Artrite (dor e inchaço nas articulações)
- ☐ Miocardite (inflamação do miocárdio)
- ☐ Pericardite (inflamação do pericárdio)
- ☐ Paralisia facial

16. Alguma vez algum médico lhe disse que tinha Doença de Lyme?

- ☐ Sim ☐ Não